

На правах рукописи

КАЗАКОВ
Василий Иванович

Ретропозоны Alu-семейства и их роль в геноме человека

03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени доктора
биологических наук

Санкт-Петербург 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Институт цитологии Российской академии наук

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАМН,
заслуженный деятель науки РФ

Самойлов Владимир Олегович

Федеральное государственное бюджетное военное образовательное
учреждение высшего профессионального образования «Военно-
медицинская академия им. С.М.Кирова» МО РФ. Зав. кафедрой
нормальной физиологии.

доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент
РАСХН, лауреат Премии Совета Министров СССР, заслуженный
деятель науки РФ

Яковлев Александр Федорович

Государственное научное учреждение Всероссийский научно-
исследовательский Институт генетики и разведения
сельскохозяйственных животных РАСХН. Зав. отделом генетики и
биотехнологии и лаб. молекулярной цитогенетики.

доктор биологических наук, профессор,

Михельсон Виктор Михайлович

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт цитологии РАН. Зав. лаб. радиационной цитологии

Ведущая организация:

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт». Федеральное
государственное бюджетное учреждение Петербургский институт ядерной физики
им. Б.П.Константинова

Защита состоится «__» июня 2014 г. в __ часов на заседании

Диссертационного совета Д.002.230.01 на базе Института цитологии РАН

по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д.4

Сайт института: www.cytspb.rssi.ru

Адрес электронной почты института: cellbio@incras.ru

Факс института: (812) 297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН

Автореферат разослан «__» _____ 2014 года

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.В.Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Если обратиться к базе данных Human Genome Resours, annotation Release 104 (URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/guide/human/index.shtml>), можно увидеть, что суммарная ядерная ДНК (диплоидный набор хромосом) женщины состоит из 6 072 607 692 н.п., а мужчины из 5 976 710 698 н.п. По разным оценкам количество нуклеотидов, необходимое для кодирования всех белков и функционально значимых РНК человека не превышает 2–3 % от этого количества. Таким образом, основная часть молекул ДНК человека, как и других эукариот, не несет информации об аминокислотной последовательности белков, не кодирует структуру рибосомных и транспортных РНК, а представляет собой некую "избыточную" ДНК, функциональное значение (или отсутствие такового) которой во многом остается не понятным. И если в конце XX века некодирующую часть генома относили к «эгоистической ДНК», то в последние годы появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что те или иные некодирующие элементы генома выполняют важные функции, в частности прямо или косвенно участвуют в регуляции экспрессии белок-кодирующих генов. Но все же, получается, что человек на сегодняшний день слабо представляет себе функциональную роль основной части (97 %) своего генома.

Особое место среди некодирующих элементов генома человека занимают ретропозоны Alu-семейства, относящиеся к классу SINE повторов (короткие диспергированные нуклеотидные элементы). Alu-повторы представлены в геноме человека $1,1 \times 10^6$ копиями, что составляет более 10% всей длины его генома.

Инсерции Alu-повторов в экзоны и промоторы белок-кодирующих генов, в область экзон-интронных границ, а также незаконная гомологичная рекомбинация между различными копиями Alu-повторов могут приводить к возникновению различных наследственных заболеваний. Многие факты свидетельствуют о том, что Alu-повторы могут участвовать в регуляции генной экспрессии, как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции. Так, например, Alu-повторы встречаются в 3'-нетранслируемой области некоторых мРНК и могут существенно влиять на их стабильность. Alu-повторы содержат в своем составе множественные CpG-динуклеотиды, являющиеся сайтами метилирования в геноме. Как известно, степень метилирования цитозина в последовательностях 5'-CG, фланкирующих 5'-область гена, коррелирует с уровнем экспрессии генов. Помимо этого в составе Alu-повторов было показано наличие сайтов связывания транскрипционных факторов (ССТФ). Однако функциональное значение единичных, изолированных ССТФ не совсем ясно, поскольку такие сайты встречаются по всему геному. Вероятно, большинство из них не играют никакой роли в регуляции экспрессии генов. Недавние исследования регуляции транскрипции у *Drosophila melanogaster*

показали, что важную роль в регуляции играет кластеризация (как в промоторной области, так и вне ее) потенциальных сайтов связывания функционально близких транскрипционных факторов. Такие кластеры получили название *цис*-регуляторных модулей (ЦРМ). Вышесказанное дает основание предполагать, что ЦРМ могут играть важную роль в регуляции экспрессии генов и у человека. Более того, поскольку ЦРМ встречаются и в составе Alu-повторов, то экспериментальное доказательство влияния таких ЦРМ на экспрессию генов было бы одновременно и доказательством участия Alu-повторов в регуляции экспрессии.

Кроме того, Alu-повторы могут служить своеобразными маркерами ДНК человека как биологического вида, так как довольно равномерно распределены по всему геному человека. В сочетании с их огромным количеством это приводит к тому, что Alu-повторы гарантированно встречаются даже в относительно коротких (несколько килобаз) фрагментах ДНК человека.

Изучение этой части генома имеет большой теоретический и практический интерес, так как позволит понять механизмы эволюции и функционирования генома, что может дать возможность влиять на работу генов, выявлять предрасположенность к различным наследственным патологиям, идентифицировать личность на генетическом уровне. Эти работы весьма актуальны для судебной и практической медицины

Данная работа посвящена изучению происхождения, распределения в геноме и функционального значения основного семейства умеренно повторяющихся последовательностей генома человека – Alu-повторов.

Цели и задачи исследования. Выяснить функциональное значение, происхождение и распределение ретропозонов Alu-семейства в геноме человека.

Научная новизна

Статья «Внеклеточная ДНК в крови беременных женщин» (**Казаков В.И.**, Божков В.М., Линде В.А., Репина М.А., Михайлов В.М., 1995) явилась одной из публикаций, которые легли в основу современных методов неинвазивной пренатальной диагностики.

Впервые экспериментально доказано, что Alu-повторы, входящие в состав промоторов генов лизосомной дезоксирибонуклеазы II (*DNAse II*) и лиганда циклофилина, модулирующего кальциевый ответ (*CAMLG*), способны влиять на экспрессию этих генов.

Впервые установлено, что инсерционно-делеционный полиморфизм AluYa5-повтора в гене ангиотензинпревращающего фермента коррелирует с развитием дисциркуляторной энцефалопатии у ликвидаторов чернобыльской аварии и уровнем свободных аминокислот в сыворотке крови больных с дисплазиями соединительной ткани.

Запатентован способ выявления предрасположенности к длительной физической работе. Патент на изобретение № 2194982.

В геноме широко распространенного паразита человека – лентеца широкого (*Diphyllobothrium latum*) открыт повторяющийся элемент, который был назван DL1.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Alu-повторы являются важными функционально значимыми элементами генома человека, а не «эгоистической ДНК», как это было принято считать ранее.
2. Alu-повторы способны регулировать экспрессию белок-кодирующих генов.
3. Alu-повторы за счет модуляции экспрессии генов и Alu-опосредованной экзонизации интронов вносят существенный вклад в генетическую гетерогенность популяции.
4. Инсерционно-делеционные полиморфизмы Alu-повторов ассоциированы с предрасположенностью к различным мультифакториальным заболеваниям
5. Alu-повторы могут служить вспомогательными сигналами при формировании факультативного гетерохроматина.

Теоретическая и практическая значимость. Работа вносит существенный вклад в разрешение проблемы «парадокса генома эукариот». Приводятся теоретические обоснования участия Alu-повторов в регуляции экспрессии белок-кодирующих генов. Факт влияния Alu-повторов на уровень экспрессии некоторых генов человека показан экспериментально. Обсуждается возможная роль Alu-повторов в Polycomb-зависимом глушении богатых генами сегментов в ходе инактивации X-хромосомы.

Большая часть работы посвящена изучению инсерционно-делеционного полиморфизма (ИДП) Alu-повторов в интронах генов *ACE*, *TPA*, *apoAI* и *FMRI*. Особо значимые результаты получены при изучении ИДП в гене *ACE*. Установлено, что этот ИДП коррелирует с высшими достижениями в различных спортивных дисциплинах, развитием дисциркуляторной энцефалопатии у ликвидаторов чернобыльской аварии и уровнем свободных аминокислот в сыворотке крови больных с дисплазиями соединительной ткани. Эти работы имеют большое значение для практической и спортивной медицины.

На основании наших исследований можно дать практические рекомендации по лечению больных с дисциркуляторной энцефалопатией. Полученные данные следует учитывать при проведении заместительной диетотерапии больных с дисплазиями соединительной ткани, наследственными аминокислотопатиями, такими как фенилкетонурия, лейциноз и треонинемия, при индивидуальном подборе препаратов, содержащих лейцин, изолейцин и фенилаланин. Установлено, что ИДП AluYa5-повтора в гене *ACE* также необходимо учитывать при выборе индивидуальных нагрузок и специализации в спорте высших достижений.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на первой (Переяславль-Залесский 1990), второй (Переяславль-Залесский 1991) всесоюзных и третьей (Черноголовка

1993) всероссийской конференции по программе «Геном человека», первой европейской конференции «Организация генома человека» (Гейдельберг 1990), восьмой конференции Международного общества дифференцировки (ISD) (Хиросима 1994), четвертом европейском конгрессе по биологии клетки (Прага 1994), всероссийской конференции «Актуальные вопросы неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики» (Уфа 1998), втором съезде ВОГиС (Санкт-Петербург 2000), втором Всероссийском съезде медицинских генетиков (Курск 2000), пятом Европейском конгрессе науки о спорте (Ювяскюля, Финляндия 2000), втором международном совещании «Ретропозоны и эволюция генома» (Сочи 2003), Всероссийской научно-практической конференции "Актуальные вопросы клиники и лечения в многопрофильном лечебном учреждении", посвященной 300-летию Санкт-Петербурга и 205-летию Военно-медицинской академии (Санкт-Петербург 2003, пленарный доклад), Международной научно-методической конференции «Проблемы молекулярной и клеточной биологии» (Томск 2007), Международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» (Пушино 2007), Международной конференции «II съезд Общества клеточной биологии совместно с юбилейной конференцией, посвященной 50-летию Института цитологии РАН» (Санкт-Петербург 2007), на курсах «Достижения медицины плода» Общества медицины плода (Лондон 2013). Материалы диссертации докладывались и обсуждались на научных семинарах лаборатории стабильности хромосом и клеточной инженерии Института цитологии РАН и на совместном семинаре лаборатории стабильности хромосом и клеточной инженерии, лаборатории радиационной цитологии, лаборатории регуляции экспрессии генов и лаборатории клеточной патологии Института цитологии РАН.

Финансовая поддержка работы. Работа выполнена при финансовой поддержке Программы ГКНТ «Геном человека», Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 94-04-13725а, 97-04-48764, 00-04-04003, 01-04-49486, 02-04-49631, 05-04-48403, 05-04-48815, 07-04-00311), гранта по поддержке ведущих научных школ НШ-1647.2003.4, INTAS Genomics grant 05-100004-7755, International Science Foundation grants R5U000 and R5U300, U.S. Civilian Research & Development Foundation for the Independent States of Former Soviet Union (CRDF), Award № ST-012-0, DeutscheForschungs gemeinschaft grants 436 RUS 113/126/1-113/126/0, Office of Science (BER) U.S. Department of Energy grant DE-FG03-01ER63070.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 22 статьи (из них 17 в отечественных, 5 в зарубежных научных журналах), 23 тезиса, глава в сборнике и 4 учебно-методических пособия (из них 2 с грифом УМО), получен 1 патент. Всего автором опубликовано 60 научных трудов.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, 3 глав, выводов и списка литературы.

Материалы и методы. Методы, использованные в работе, материалы и оборудование, объекты исследования подробно описаны в соответствующих разделах диссертации и опубликованных по теме диссертации статьях (см. список).

ВВЕДЕНИЕ

Строение Alu-повторов. В составе большинства Alu-повторов имеется сайт рестрикции (AGCT) для эндонуклеазы рестрикции *AluI*. Этот сайт расположен приблизительно в 170 н.п. от начала повтора. Благодаря этому Alu-повторы получили свое название. Эндонуклеаза рестрикции была названа так, потому что впервые была выделена из *Arthrobacter luteus* (Roberts et al., 1976) Длина консенсусной последовательности Alu-повторов составляет 282 н.п. Отдельные представители семейства могут иметь различную длину за счет вариабельных областей и вариаций длины, входящих в состав повтора полиадениновых участков. Собственно, Alu-повтор представляет собой димер, состоящий из двух прямых повторов длиной 130 н.п., разделенных богатой аденином вставкой. Правый мономер длиннее левого на 31 п.н. Богатая аденином последовательность имеется и на 3'-конце второго мономера. Оба мономера Alu-повтора гомологичны друг другу на 80%. В составе всего повтора можно выделить 3 консервативные и 2 вариабельные области. Каждый Alu-повтор фланкирован прямыми повторами длиной от 7 до 20 н.п.

Левый мономер Alu-повтора содержит функционально активный внутренний промотор для РНК-полимеразы III, состоящий из двух элементов, называемых Вох-А и Вох-В. Вох-А располагается на участке +4/+37 и представляет собой последовательность 5'-RRYNNRRYGG-3'. Вох-В находится в области +70/+86, его последовательность 5'-GWTCRANNC-3'. Вох-В является необходимым и достаточным для относительно точной, хотя и неэффективной инициации транскрипции *Alu in vitro*, наличие Вох-А значительно увеличивает эффективность транскрипции. Таким образом, внутренний промотор для РНК-полимеразы III сходен с промоторами генов тРНК (Perez-Stable et al., 1984).

Распределение Alu-повторов в геноме человека. Огромное количество Alu-повторов распределено в геноме человека более или менее равномерно. Значительная их часть соседствует с уникальными функционально значимыми последовательностями. Alu-повторы часто фланкируют структурные гены, присутствуют в интронах, экзонах и промоторах. В геноме человека встречаются и довольно протяженные кластеры Alu-повторов, причем входящие в них Alu-повторы могут быть как в одинаковой ориентации, так и инвертированными по отношению друг к другу. В работах 90-х гг. распределение Alu-повторов в индивидуальных хромосомах выясняли методом гибридизации *in situ*. После завершения работ по секвенированию генома человека для этих целей стал широко применяться компьютерный

анализ. Так, удалось установить, что значительное количество Alu-повторов инвертировано, один Alu-повтор в среднем встречается на протяжении трех килобаз. Alu-повторы эволюционно древних подсемейств имеют тенденцию образовывать кластеры, в то время как молодые Alu-повторы преимущественно расположены одиночно и не локализованы рядом с древними повторами (Jurka et al., 2003). Alu-повторы в целом «предпочитают» GC-богатые участки генома. Однако повторы, принадлежащие к молодым подсемействам, могут быть распространены и в AT-богатых районах. Размер хромосомы никак не коррелирует с количеством локализованных в ней Alu-повторов. По такому показателю, как отношение общей длины всех копий повтора в данной хромосоме к длине этой хромосомы, лидирует 19-я хромосома (26,3 %), минимальное значение показано для Y хромосомы (7,5 %). Частота встречаемости Alu-повторов в генах выше, чем в межгенных промежутках для всех хромосом, за исключением 22-й и 19-й хромосом (Grover et al., 2004). Установлена сильная корреляция ($P < 0,0001$) между плотностью распределения генов и Alu-повторов. Примерно 75% всех генов имеют в своем составе, как минимум, один Alu-повтор. Если вычислить отношение общей длины всех копий Alu-повторов, локализованных в интронах и экзонах, к их длине, то для интронов это значение составит 12,8 %, а для экзонов – 1,6 % (Grover et al., 2004).

Гены различных функциональных категорий не одинаково обогащены Alu-повторами. Гены, кодирующие белки, вовлеченные в процессы метаболизма, транспорта и сигнализации, являются, как правило, Alu-богатыми. Структурные гены, наоборот, содержат небольшое количество Alu-повторов. Сказанное справедливо для 21-й и 22-й хромосом (Grover et al., 2003). Наконец, Alu-повторы, как правило, «избегают» импринтированных районов генома (Greally, 2002).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Международная программа «Геном человека». Изучение Alu-повторов *in silico* стало возможным после полного секвенирования генома человека. Особенности распределения Alu-повторов в геноме сыграли существенную роль на начальном этапе международной программы «Геном человека» – этапе физического картирования хромосом. Детальное картирование хромосом (с разрешением около 100 килобаз) является необходимым этапом в процессе полного секвенирования генома высшего эукариотического организма, в том числе и человека. Очевидно, что столь грандиозная задача даже при применении современных методов секвенирования не может быть решена «с нуля» силами одной лаборатории и тесная кооперация ученых представляется неизбежной. При этом возникает проблема совмещения разнородных данных, полученных при использовании различных маркеров, в уже имеющихся генетических и рестрикционных картах.

Еще в 1989 г. было признано, что такое препятствие на пути картирования хромосом можно преодолеть, приняв за основу карту, составленную на основе так называемых участков, отмеченных последовательностью нуклеотидов (sequence tagged sites – STS) с известной локализацией в хромосоме (Olson et al., 1989). Например, около 30 000 STS, равномерно распределенных по геному с интервалами 100 килобаз достаточно для картирования хромосом человека. Для этих целей существенным является требование уникальности STS. Способ же их получения может быть любым. В частности, в качестве STS могут выступать уникальные фрагменты ДНК, локализованные между Alu-повторами.

Как уже отмечалось, Alu-повторы более или менее равномерно распределены по всему геному человека. Это дает возможность получения уникальных фрагментов ДНК, локализованных между Alu-повторами, после проведения ПЦР, при этом в качестве матрицы может выступать ДНК, выделенная, из различных источников – клонотек, созданных на основе фага λ и космид, из изолированных хромосом человека, даже из индивидуальных клонов геномных клонотек в фаге λ , имеющих вставки 10-15 килобаз. В наших исследованиях продемонстрирована реальность такого подхода (Светлова М.П., **Кзаков В.И.**, Тимченко Д.И. и др., 1995; **Кзаков В.И.**, Светлова М.П., Бойко В.П. и др., 1996).

В Alu-повторах имеются достаточно консервативные участки, на которые могут быть синтезированы олигонуклеотидные праймеры для ПЦР (см. рис.1). Последовательности всех праймеров и зондов, кроме Tc65 (Nelson et al., 1989), были сконструированы нами по консенсусной последовательности Alu-повторов. При использовании в ПЦР двух разных праймеров амплифицируются фрагменты Alu-повтора различной длины. В случае использования в ПЦР лишь одного концевой праймера (3' или 5') амплифицируются уникальные фрагменты, расположенные между инвертированными копиями Alu-повторов (интер-Alu-фрагменты). 3'-Alu-праймеры амплифицируют участки генома, фланкированные расходящимися Alu-повторами, 5'-Alu-праймеры – сходящимися инвертированными Alu, а использование и 3'-прямых, и 5'-обратных праймеров в одной ПЦР позволяет амплифицировать последовательности, расположенные между и прямыми, и инвертированными Alu-повторами. В данном случае один олигонуклеотид будет выполнять в ПЦР роль и прямого, и обратного праймеров.

ПЦР-праймеры и зонды для повторов Alu-семейства

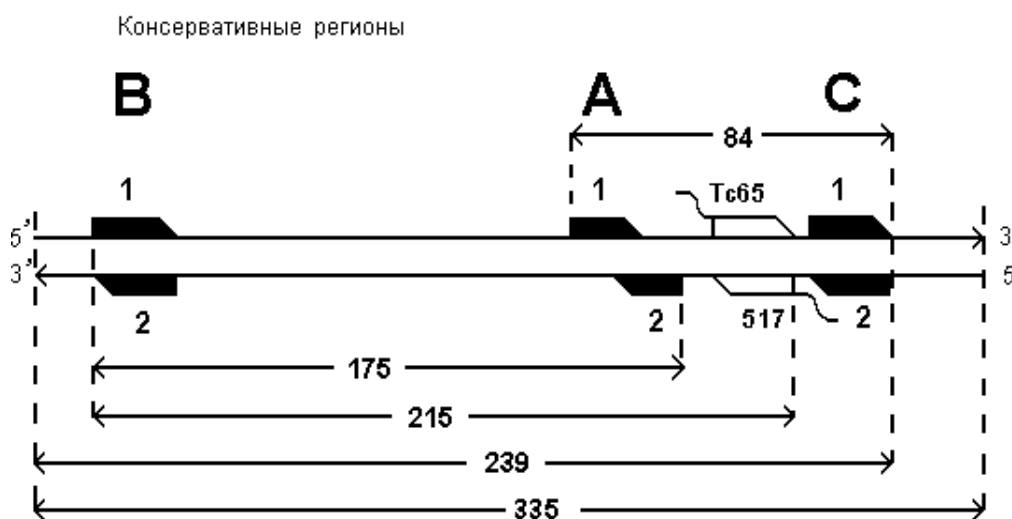


Рисунок 1. Праймеры и зонды для повторов Alu-семейства. Цифры – длина амплифицируемых фрагментов ДНК в н.п. при использовании различного сочетания праймеров. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов приведены в диссертации.

Например, нами были получены уникальные интер-Alu-фрагменты при использовании в качестве матрицы ДНК, выделенной из гибридных клеток мышей, содержащих остаточную хромосому 3 человека, а также из индивидуальных клонов, содержащих фрагменты ДНК человека из *NotI*-связующей клонотеки тех же гибридных клеток. В этих опытах использовался праймер Tc65, амплифицирующий участки между расходящимися Alu-повторами. Ясно, что на индивидуальных клонах со вставками порядка 10 килобаз частота инициации синтеза ДНК с одиночным праймером может быть недостаточной, и поэтому в опытах с индивидуальными клонами *NotI*-связующей клонотеки мы использовали как одиночные праймеры, так и пары праймеров, комплементарные различным цепям Alu, т.е. иницирующие синтез в различных направлениях от Alu-повторов и способные амплифицировать фрагменты, фланкированные Alu-повторами, например, праймеры С1 и В2 (см. рис.1). Почти все исследованные *NotI*-связующие клоны дают дискретные наборы фрагментов после ПЦР с указанными праймерами. Для подтверждения уникальности этих фрагментов мы использовали блот-гибридизацию по Саузерну с меченой P^{32} Alu-пробой. Оказалось, что во многих клонах образующиеся ПЦР-фрагменты гибридизуются с Alu-повторами, то есть не являются уникальными, хотя среди них были и уникальные фрагменты, не гибридизующиеся с Alu-повторами. Мы также получили дискретные фрагменты после ПЦР с праймерами С1 и В2 при использовании в качестве

матрицы космидных клонов 3-й хромосомы, и некоторые из них были идентифицированы как уникальные. Картина уникальных фрагментов, получаемая с помощью интер-Alu-ПЦР, из клонов, содержащих длинные вставки с Alu-повторами (например, космидных или YAC-клонов), может быть способом идентификации этих клонов и установления их перекрывания. Очевидно, что такой подход может быть применен и в отношении еще не исследованных геномов, так как в геномах всех изученных к настоящему времени эукариотических организмов обнаружены специфические повторы.

Alu-повторы в составе внеклеточной ДНК человека. К началу 90-х годов уже был широко известен и общепризнан тот факт, что внеклеточная ДНК существует в плазме и сыворотке крови людей и других млекопитающих. Считалось, что эта ДНК возникает из-за распада различных клеток. Более того, уже в 70-х годах было известно, что в крови беременных женщин присутствуют клетки плода (Simpson, Elias 1993). Симпсону с соавторами и Бьянки с соавторами, используя такие маркеры как CD71 и гликофорины, удалось выделить клетки плода из крови беременных женщин. Симпсон идентифицировал клетки плода как ядродержащие эритробласты, Бьянки – как клетки трофобласта, эритроциты и лейкоциты (Bianchi et al., 1990; Simpson, Elias, 1993).

Таким образом, к середине 1990-х годов стало очевидно, что кровь беременных женщин должна содержать и внеклеточные нуклеиновые кислоты плода. Источником нуклеиновых кислот плода должны быть клетки трофобласта и живые клетки плода, которые, после их смерти, неизбежно становятся источником внеклеточной ДНК и РНК. Наличие нуклеиновых кислот плода в крови беременных женщин открывало возможность для развития неинвазивных методов пренатальной диагностики. Собственно Симпсон и Бьянки показали, что, используя ПЦР с маркерами, специфичными для Y-хромосомы, в клетках плода, выделенных из кровотока матери, можно амплифицировать фрагменты Y-хромосомы. Таким образом, эти авторы неинвазивными методами определили пол плода. Однако такие работы были трудоемкими и дорогостоящими.

Существенным достижением для становления неинвазивной пренатальной диагностики стала бы прямая амплификация внеклеточной ДНК беременных женщин (среди которой очевидно должна была содержаться и ДНК плода), минуя стадию выделения клеток плода из кровотока матери. В 1995 году нам впервые удалось продемонстрировать, что внеклеточную ДНК беременных женщин можно амплифицировать методом ПЦР. Наша работа показала, что в крови матери содержится достаточно внеклеточной ДНК для обнаружения (после удаления кровяных клеток) последовательностей Alu-повторов и уникальных фрагментов ДНК, фланкированных Alu-повторами, которые присутствуют в составе внеклеточной ДНК (**Казиков**

В.И., Божков В.М., Линде В.А. и др., 1995). В нашей статье "Внеклеточная ДНК в крови беременных женщин" описано, что с помощью ПЦР мы амплифицировали выделенные из сыворотки беременных женщин фрагменты ДНК, содержащие Alu-повторы. При этом так же могли амплифицироваться и Alu-содержащие фрагменты ДНК плода. В ПЦР были использованы праймеры, с помощью которых возможно амплифицировать собственно Alu-повторы человека и любые фрагменты ДНК, фланкированные инвертированными Alu-повторами. При использовании в ПЦР пары праймеров B2 и C1 (см. рис. 1) амплифицируются сами Alu-повторы, при этом матрицей для ПЦР могут служить любые фрагменты ДНК, содержащие Alu-повторы. Такие фрагменты были обнаружены в сыворотке всех субъектов исследования, включая мужчин, небеременных женщин и беременных женщин в первом и последнем триместре. При этом длина амплифицированных фрагментов составляла около 300 н.п. При использовании в ПЦР только одного праймера Tc65 были амплифицированы фрагменты ДНК, фланкированные инвертированными Alu-повторами только из сыворотки беременных женщин в первом триместре беременности (**Кзаков В.И.**, Божков В.М., Линде В.А. и др., 1995). В нашей статье сделано предположение, что источником внеклеточной ДНК в крови беременных женщин могут быть как клетки материнского организма (клетки эндометрия и лимфоциты), так и клетки плода (трофобласта).

В 1995 году мы показали, что Alu-повторы, которые присутствуют в ДНК матери и плода могут быть обнаружены во внеклеточной ДНК, выделенной из крови матери. Последовательности и локализация Alu-повторов в геноме могут отличаться у разных людей. При этом важно, что между инвертированными Alu-повторами часто находится уникальная нуклеотидная последовательность и различия в длине спейсерной ДНК, локализованной между инвертированными Alu-повторами, инвариантны (**Кзаков В.И.**, Светлова М.П., Бойко В.П. и др., 1996). На основе нашей статьи, а также публикаций Симпсона с соавт. и Бьянки с соавт., исследователи вправе были ожидать, что, по крайней мере, некоторые фрагменты ДНК плода могли бы присутствовать в плазме и сыворотки крови матери.

Позже доктору Ло с соавторами удалось во внеклеточной ДНК беременных женщин амплифицировать последовательности Y хромосомы и *RhD* гена, которые ребенок должен был унаследовать от своего отца, так как Y хромосома отсутствует в геноме матери, и женщины были резус-отрицательными (Lo et al., 1997). В дальнейшем, в результате развития методов количественного анализа (количественная ПЦР) и параллельного секвенирования нового поколения, стала возможна неинвазивная пренатальная диагностика анеуплоидий, а в отдельных случаях и точечных мутаций плода.

Таким образом, наша статья 1995 года явилась одной из публикаций, которые легли в основу современных методов неинвазивной пренатальной диагностики.

Амплификация Alu-повторов в геноме человека. Усиленная амплификация Alu-повторов в геноме человека началась 35-65 миллионов лет назад. Считается, что в этот период у каждого новорожденного примата *de novo* происходила одна инсерция Alu-повтора. В настоящее время ретропозонный потенциал сохранили лишь представители эволюционно молодого AluY подсемейства, поэтому скорость амплификации Alu-повторов в геноме замедлилась до одной инсерции на 100-200 новорожденных (Deininger, Batzer 1999). Некоторые представители эволюционно молодого AluY подсемейства интегрировались в геном человека настолько недавно, что еще не смогли распространиться по всей человеческой популяции и являются полиморфными. Отдельные Alu-повторы могут присутствовать только в одной популяции, одной семье или даже у одного конкретного человека (Batzer, Deininger 2002). Такие полиморфизмы, как хорошо изученный инсерционно-делеционный полиморфизм (ИДП) AluYa5-повтора в 16-м интроне гена ангиотензинпревращающего фермента (*ACE*), могут иметь даже диагностическое значение, так как ассоциированы с предрасположенностью к различным мультифакториальным заболеваниям. Большинство представители AluY подсемейства не являются полиморфными. Например, нами показано отсутствие полиморфизма AluY-повтора в гене *FMR1*, по крайней мере, у жителей г. Санкт-Петербурга и Ленинградской области (Аксёнов Н.Л. и Казаков В.И., 1998). Экспансия тринуклеотидных повторов CGG в 5'-нетранслируемую область этого гена приводит к синдрому X-сцепленной умственной отсталости (синдром Мартина-Белла). Некоторые исследователи считают, что Alu-повторы могут служить источником зарождения и влиять на экспансию микросателлитов у приматов (Santosh et al., 1995).

С другой стороны, далеко не для всех полиморфных Alu-повторов в настоящее время показана ассоциация с какой-либо патологией или фенотипическими особенностями. Например, мы не нашли корреляции ИДП AluYa5-повтора, локализованного в 8-м интроне гена тканевого активатора плазминогена (*tPA*), с диагнозом тромбофилия. Правда, мы показали, что нуклеотидная последовательность этого Alu-повтора сильно гетерогенна. Возможно, отсутствие ассоциации ИДП с диагнозом тромбофилия обусловлена именно этим.

Alu-повторы относятся к ретропозонам - мобильным элементам генома, которым для ретропозиции требуется этап обратной транскрипции. Считается, что все non-LTR ретропозоны имеют одинаковый механизм ретропозиции, однако механизм ретропозиции Alu-повторов все же во многом остается гипотетическим и дискуссионным. Так же не ясно, почему основная масса Alu-повторов внезапно потеряла ретропозонный потенциал. Так или иначе, в клетке

должен существовать какой-то механизм подавления размножения ретропозонов, в противном случае безудержная амплификация рано или поздно привела бы к запредельному увеличению размера генома.

Известно, что в ходе длительного существования в культуре клетки претерпевают значительные изменения, связанные с изменением микроокружения, нарушением регуляторных воздействий и ряда других факторов. В ходе адаптации к условиям культивирования при образовании устойчивой кариотипической структуры происходят различные изменения качественного и количественного состава хромосом, направленные на создание оптимального генного баланса. Явление увеличения размера генома клеток в культуре, свидетельствующее о присутствии избыточной ДНК, было описано достаточно давно (Розанов и др., 1984).

Методом гибридизации с радиоактивно мечеными зондами нами было определено соотношение Alu/L1-повторов в длительно культивируемых клеточных линиях K-562, CCRF-SB, NC-37, MOLT-3, M-HeLa, SW837 и MG-63. Соотношение Alu/L1-повторов в геномах данных клеточных линий осталось неизменным и соответствует таковому в нормальном геноме. Это говорит о том, что увеличение размера генома клеток в культуре происходит не за счет увеличения количества Alu или L1 повторов, следовательно, механизм подавления амплификации Alu и L1 повторов функционирует даже при длительном культивировании клеток человека.

Роль Alu-повторов в геноме человека. С Alu-повторами связано до 0,1 % всех наследственных моногенных заболеваний человека. Наследственные заболевания человека, обусловленные Alu-повторами, связаны с двумя основными факторами - инсерционной инактивацией генов за счет ретропозиций *de novo* и индукцией перестроек генома за счет незаконных гомологичных рекомбинаций между разными копиями Alu-повторов. В качестве примеров заболеваний, вызванных в том числе и первым фактором, можно привести ахолинэстеразную, гемофилию А и В, рак молочной железы, синдром Альпорта, синдром Аперта, нейрофиброматоз I типа, гиперпаратиреоз новорожденных, болезнь Менкеса, неполипозный колоректальный рак и многие другие. Второй фактор (наряду с другими причинами) вызывает гиперхолестеролэмию, α -талассемию, синдром Элерса-Данлоса I типа, миодистрофию Дюшенна, инсулиннезависимый сахарный диабет, гипо- β -липопротеинемию, синдром Леш-Нихана, мукополисахаридоз IVA типа, тромбофилию, болезнь Тея-Сакса и многие другие.

Инсерционно-делеционные полиморфизмы Alu-повторов ассоциированы с предрасположенностью к различным мультифакториальным заболеваниям. Выше уже отмечалось, что некоторые представители AluY подсемейства являются полиморфными и могут присутствовать в геноме одного конкретного человека и отсутствовать у другого. По наличию

или отсутствию Alu-повтора в конкретном локусе можно выделить делеционный (D) и инсерционный (I) аллели, а генотипы людей описать как делеционная гомозигота (DD), инсерционная гомозигота (II) и гетерозигота (ID). Так, ИДП гена *ACE* (MIM: 106180.0001) определяется наличием или отсутствием AluYa5-повтора в 16-м интроне (Tiret et al., 1992). При этом D аллель (особенно в гомозиготном состоянии) ассоциирован с развитием атеросклероза, диабетической нефропатии, гипертрофии левого желудочка, а I аллель - с предрасположенностью к болезни Альцгеймера. В ряде работ показана корреляция D аллеля с гипертонической болезнью, инфарктом миокарда, ишемическим инсультом, в других работах такая корреляция отрицается. Существует также огромное количество работ, посвященных изучению ассоциации ИДП AluYa5-повтора в гене *ACE* с различными клиническими проявлениями. Исследования не ограничивались лишь определением наличия или отсутствия заболевания, но включали также другие аспекты: симптомы и манифестация заболевания, эффективность медикаментозной и иной терапий, скорость ремиссии, прогрессия заболевания и его исход. Мета-анализ показал, что корреляция наблюдается только в том случае, когда свой вклад в манифестацию заболевания вносят другие генетические факторы и факторы окружающей среды, способствующие развитию болезни, что характерно для всех мультифакториальных заболеваний человека.

Нам, например, удалось показать, что D аллель ассоциирован с дисциркуляторной энцефалопатией, причем эта ассоциация проявляется только у ликвидаторов аварии на Чернобыльской АЭС, то есть у лиц, получивших определенную дозу облучения. По результатам этой работы были даны рекомендации по применению ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (АПФ), таких как каптоприл и рамиприл, для лечения дисциркуляторной энцефалопатии у лиц с генотипом DD (Kehoe A.D., Nikiforov A.M., Alexanin S.S., Neronov E.G., Tikhomirova O.V., Shun'kov V.B., Makarova N.V., Rabinovich E, Usmanova N.M, **Kazakov V.I.**, Slozina N.M., Montgomery H.E., 2009). Очевидно, что для медицины будущего подбор лекарственных препараты в зависимости от генотипа пациента и влияния факторов окружающей среды станет обычным делом.

Как правило, полиморфные Alu-повторы локализованы в интронах, но могут встречаться и в промоторах различных генов. В качестве примера можно привести Alu-повтор, локализованный в промоторе гена аполипопротеина AI. В нашем исследовании показано, что ИДП этого Alu-повтора, возможно, является фактором второго порядка в генезе дислипопротеидемии при ожирении у больных раком эндометрия (Сафина Н.С., Урманчеева А.Ф., Томилин Н.В., Кришен О.В., Аксёнов Н.Л., **Казakov В.И.**, Кашина Н.О., Арефина Н.В., 2000).

Alu-повторы за счет модуляции экспрессии генов и Alu-опосредованной экзонизации интронов вносят существенный вклад в генетическую гетерогенность популяции. Чем больше генетическая гетерогенность популяции, тем выше ее адаптивная способность. С этой точки зрения, Alu-повторы могли играть важную роль в микроэволюции человека. Примером полиморфного Alu-повтора, прямо или косвенно влияющего на фенотип, опять же может быть AluYa5-повтор в 16-м интроне гена *ACE*. Продуктом гена *ACE* является ангиотензинпревращающий фермент (АПФ). Было установлено, что уровень АПФ в плазме крови у DD в два раза выше, чем у II, в то время как у ID эта величина является промежуточной (Rigat et al., 1990). АПФ - ключевой фермент ренин-ангиотензиновой и кинин-калликреиновой систем, важнейших гуморальных регуляторов гемодинамики и электролитного баланса организма. АПФ катализирует превращение неактивного декапептида ангиотензина I в активный октапептид ангиотензин II, который выполняет целый ряд функций в организме человека, в частности, является мощным вазоконстриктором. Вторым важнейшим субстратом фермента является сильный вазодилататор брадикинин. Под действием АПФ происходит деградация брадикинина и превращение его в неактивную форму. АПФ-опосредованное увеличение ангиотензина II и уменьшение его антагониста брадикинина в конечном итоге приводит к тому, что гипертрофия левого желудочка встречается у DD достоверно чаще, чем у II (Sayed-Tabatabaei et al., 2006).

ИДП в гене *ACE* влияет и на такой показатель, как выносливость и физическая работоспособность человека. Длительные физические тренировки спортсменов, направленные на развитие выносливости, способствуют увеличению физической работоспособности, как у мужчин, так и у женщин, носителей генотипа II или ID, тогда как у носителей генотипа DD прирост работоспособности у представителей обоих полов существенно меньше. Таким образом, II обладают большей предрасположенностью к выполнению длительной физической нагрузки, чем DD. Этот факт важно учитывать в разных сферах человеческой деятельности, связанных с повышенной двигательной активностью, от спорта до работы в экстремальных условиях (Рогозкин В.А., Назаров И.Б., **Казаков В.И.**, 2002).

Повышенная частота I аллеля, связанная с некоторыми аспектами выносливости, обнаружена в группе элитных британских бегунов (Myerson et al., 1999) и альпинистов (Montgomery et al., 1998), австралийских (Gayagay et al., 1998) и хорватских гребцов (Jelakovic et al., 2000), а также у испанских элитных спортсменов (Alvarez et al., 2000). Избыток D аллеля наблюдался в группе элитных спортсменов - спринтеров в плавании и беге (Woods et al., 2000; Myerson et al., 1999). Однако в литературе в то время велась серьезная дискуссия по поводу воспроизводимости таких ассоциаций, при этом некоторые исследователи вообще не смогли

показать ассоциацию любого из аллелей с выносливостью или физической работоспособностью у элитных спортсменов. Так, Тейлор с соавторами изучили распределение I и D аллелей у хоккеистов, велосипедистов, лыжников, легкоатлетов, пловцов, гребцов, гимнастов и ни в одной группе им не удалось показать статистически значимых различий в частотах этих аллелей с популяционной выборкой (Taylor et al., 1999). Чтобы разобраться с этим вопросом, мы решили исследовать возможную ассоциацию ИДП AluYa5-повтора в гене *ACE* с высшими спортивными достижениями у российских спортсменов.

Вначале мы не наблюдали значимого отличия частот I и D аллелей у элитных спортсменов по сравнению с контрольной выборкой, потому что, как и все исследователи, объединяли спортсменов в группы по видам спорта. Однако при исследовании генотипов спортсменов, специализирующихся в таких видах спорта, как гребля, плавание и триатлон, стали проявляться некоторые различия в частоте встречаемости аллелей. У пловцов отмечалось повышение частоты встречаемости I аллеля и, следовательно, снижение частоты D аллеля. Наоборот, у спортсменов, занимающихся греблей, плаванием на марафонские дистанции, и особенно у триатлонистов частота I аллеля снижена и повышена частота D аллеля.

Самые интересные результаты получились, когда Игорь Борисович Назаров предложил распределить спортсменов не по видам спорта, а по типу энергообеспечения, который при выполнении соревновательных нагрузок известен заранее. В соответствии с этим спортсмены были разделены на три группы. Группа SDA (short distance athletes) включала спринтеров, специализирующихся на выполнении кратковременных высокоинтенсивных нагрузок, энергообеспечение которых происходит по анаэробному пути. Группа MDA (middle distance athletes) состояла из средневики, характеризующихся смешанным типом энергообеспечения. В группу LDA (long distance athletes) входили марафонцы (аэробный тип энергообеспечения). Кроме того, спортсмены были подразделены на высококвалифицированных (чемпионы России, мира и Олимпийских игр) и квалифицированных (кандидаты и члены сборных команд России).

Среди спринтеров обнаружено достоверное смещение распределения генотипов. У этих спортсменов преобладает генотип DD, соответственно снижена частота I аллеля. Среди группы MDA, наоборот, преобладали генотипы II и ID, и была снижена частота D аллеля. Частоты встречаемости аллелей у марафонцев (группа LDA) не отличались от таковых у контрольной группы (см. рис. 2). Указанные различия гораздо ярче выражены у высококвалифицированных спортсменов, чем у просто квалифицированных спортсменов. Это можно объяснить тем, что среди спортсменов в процессе их спортивной карьеры происходит своеобразный отбор, в результате чего высших достижений в спорте, в зависимости от спортивной специализации, достигают преимущественно лица с тем или иным генотипом. По нашим предположениям, у

спринтеров генотип DD преобладает потому, что в процессе выполнения соревновательных нагрузок они используют энергетические субстраты, уже имеющиеся в мышцах. Повышенный уровень ангиотензина II в процессе тренировок приводит, в частности, к гипертрофии скелетных мышц, что при прочих равных условиях может служить преимуществом для спринтеров - носителей генотипа DD.

Средневидам, в отличие от спринтеров, необходима срочная доставка кислорода из легких в скелетные мышцы для обеспечения аэробных процессов. Естественно, что определенное преимущество получают спортсмены, у которых наблюдается повышенное кровоснабжение скелетных мышц за счет увеличения просвета сосудов, что может быть следствием пониженной концентрации ангиотензина II в крови и тканях у лиц с генотипом II.

У марафонцев интенсивность снабжения мышц кровью не имеет такого решающего значения, как у средневидам. На первый план выходит не срочная доставка кислорода к мышцам, а экономия энергетических ресурсов организма. Скорее всего, этим можно объяснить тот факт, что у марафонцев (как квалифицированных, так и высококвалифицированных) не наблюдается достоверных различий в частотах I и D аллелей по сравнению с контрольной группой (Рогозкин В.А., Назаров И.Б., **Казakov В.И.**, 2000; Nazarov I.B., Woods D.R., Montgomery H.E., Shneider O.V., **Kazakov V.I.**, Tomilin N.V., Rogozkin V.A., 2001).

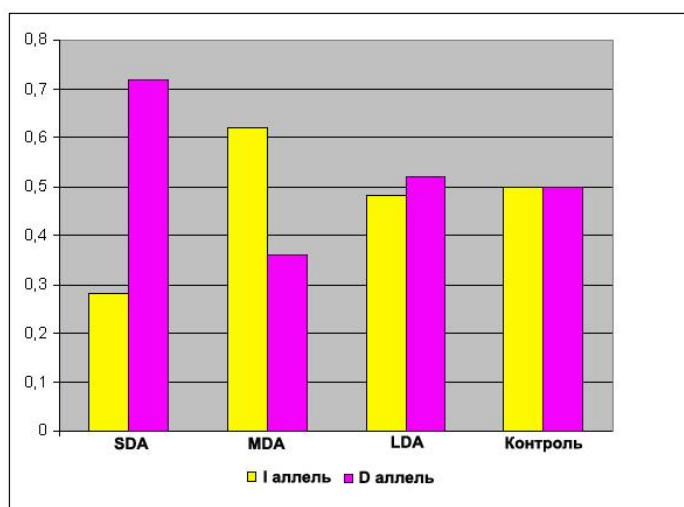


Рисунок 2. Частоты I и D аллелей у 141 выдающегося российского спортсмена (пояснения обозначений в тексте).

В большинстве видов спорта отбор спортсменов проводится тренерами на основании физической готовности на момент отбора. Потенциальные возможности достижения высших спортивных результатов в будущем учесть очень сложно. Нами показано, что ИДП AluYa5-повтора в гене ACE может являться одним из факторов генетической предрасположенности человека к выполнению различных физических нагрузок, что может помочь тренерам и

спортсменам в выборе спортивной специализации еще в юном возрасте, открывает реальные возможности применения дифференцированного подхода к проведению тренировочного процесса.

Помимо ангиотензина I субстратами АПФ являются олигопептиды различного строения. Путем гидролиза пептидных связей фермент может превращать неактивную форму пептида в активную, инактивировать пептид, либо просто изменять активность пептида. Субстратами АПФ являются ангиотензин I, брадикинин, каллидин, гемопоэтический пептид, энкефалин, нейротензин, люлиберин, атриопептин II, бета-амилоидные белки A β 40 и A β 42 и многие другие. От своих субстратов фермент отщепляет C-концевые дипептиды, реже - трипептиды. Проанализировав ди- и трипептиды, отщепляемые АПФ от его основных субстратов, мы пришли к выводу, что в их состав входит неодинаковое количество различных аминокислотных остатков. Поскольку уровень фермента в крови у DD превосходит таковой у II почти в два раза, у нас возникло предположение о возможной корреляции между ИДП AluYa5-повтора в гене *ACE* и уровнем некоторых аминокислот в плазме крови людей.

Нами был определён генотип 102 больных коллагенопатиями (25 человек II, 51 человек ID и 26 человек DD). У этих же пациентов методом ВЭЖХ определен уровень свободных аминокислот в плазме крови. Гистограмма, отражающая распределение среднего значения уровня свободных аминокислот в плазме крови пациентов в зависимости от генотипа, приведена на рис. 3. Во всех случаях различия между II и ID, а также между DD и ID оказались недостоверными. У ID уровень всех аминокислот в крови практически не отличался от средних значений. У DD повышен уровень Leu+Ile ($P = 0,03$) и Phe ($P = 0,004$) по отношению к II. Использованным нами методом было невозможно надёжно разделить лейцин и изолейцин, поэтому приводятся средние значения уровня смеси лейцин + изолейцин. Для всех остальных аминокислот различия между DD и II в уровне свободных аминокислот в плазме крови оказались недостоверными. Лейцин и фенилаланин наиболее часто отщепляются АПФ от всех своих субстратов. Очевидно, что количества каждого отдельно взятого субстрата АПФ не столь значительны, чтобы различия в уровне отщепившихся от него аминокислот были достоверными, даже в случае, когда повышен уровень фермента, и только суммарный вклад подавляющего большинства субстратов АПФ оказывается значимым.

При этом трудно, если вообще возможно, оценить вклад в уровень свободных аминокислот в плазме крови человека каждого конкретного субстрата АПФ. Особое значение уровень свободных аминокислот имеет при лечении различных наследственных коллагенопатий. Полученные нами данные следует учитывать при проведении заместительной диетотерапии ряда наследственных аминокислотопатий, таких как фенилкетонурия, лейциноз и

треонинемия, при индивидуальном подборе препаратов, содержащих аминокислоты. Генетически обусловленный уровень эндогенных аминокислот также важно учитывать при безфенилаланиновой диете, применяемой для лечения фенилкетонурии. Активность АПФ можно снизить, используя такие его ингибиторы, как каптоприл, эналаприл, лизиноприл и др., что может быть в данном случае применимо для лиц с генотипом DD, но не ID или II.

В нашей работе исследовалась корреляция ИДП в гене АПФ с уровнем свободных аминокислот в плазме крови больных коллагенопатиями. Мы считаем, что полученные результаты вполне можно экстраполировать и на здоровых людей. По нашим данным, нет достоверных различий в частотах I и D аллелей между больными коллагенопатиями, населением г. Санкт-Петербурга ($P = 0,48$) и населением европейских стран ($P = 0,84$) при использовании метода χ^2 . Уровень Leu+Phe и Phe в крови больных коллагенопатиями также не отличается от этого показателя у здоровых людей. Очевидно, найденные нами закономерности носят общий характер, а рекомендации по снижению активности АПФ справедливы и для других больных (Казиков В.И., Кадурина Т.И., Усманова Н.М., Томилин Н.В., 2003).

Консенсусная последовательность Alu-повторов содержит 9 потенциальных акцепторных сайтов сплайсинга YYYYYYYYYNYAG↓R и 14 донорных – AG↓GTRA. При этом 19 из 23 возможных сайтов содержатся в минус-цепи консенсусной последовательности Alu-повторов. По разным оценкам, от 30 до 60% генов человека подвержено альтернативному сплайсингу. При сравнении баз данных кДНК и экспрессирующихся последовательностей человека было обнаружено, что примерно 5,2% альтернативно сплайсирующихся внутренних экзонов возникают благодаря Alu-повторам (Sorek et al., 2002). Инсерция Alu-повтора в экзон может привести к интронизации, вследствие чего в мРНК будут отсутствовать один или несколько экзонов. Такие альтернативные транскрипты могут превращаться в конститутивные. Так, трансляция Alu-повтора в гене казеин киназы 2 (*CSNK2*) привела к возникновению дополнительной изоформы α -субъединицы фермента, которая характеризуется строгой внутриядерной локализацией (Hilgard et al., 2002). Другим примером является ген *Bcl-rambo*. Alu-экзонизация в этом гене привела к возникновению альтернативного, преждевременно терминирующегося транскрипта. В результате синтезируется усеченный белок Bcl-rambo β , который способствует этопозид- и таксол-индуцированной клеточной гибели. Нативный белок не обладает подобными апоптотическими функциями. Изоформа β экспрессируется в сердце и лимфатических узлах. В отличие от нативного белка изоформа β локализована в цитозоле, а не в мембране митохондрий, так как не имеет С-терминального якорного домена (Yi et al., 2003).

Влияние ИДП в гене *ACE* на выносливость и физическую работоспособность человека является прекрасным примером влияния Alu-повторов на адаптивные возможности человека.

Другой такой пример - снижение когнитивных способностей у лиц с генотипом DD после 60 лет (Richard et al., 2000). Адаптивные возможности человека могут определяться и широким спектром колебаний уровня свободных аминокислот в плазме крови. Возникновение же новых изоформ белков может иметь идиоадаптивное значение.

Alu-повторы участвуют в регуляции генной экспрессии. Экспрессия эукариотических генов контролируется, главным образом, специфическими белками (транскрипционными факторами), которые связываются с относительно короткими значащими последовательностями, локализованными как до, так и после последовательностей, кодирующих белки. Все эти регуляторные последовательности представляют собой сайты связывания транскрипционных факторов (ССТФ). Для регуляции генной экспрессии очень важно присутствие этих сайтов и количество их копий внутри гена. Ретропозоны Alu-семейства содержат некоторые высокоспецифичные ССТФ, которые могут служить в качестве сигналов регуляции экспрессии генов, транскрибируемых РНК-полимеразой II.

У большинства высших эукариот модификация остатков цитозина происходит исключительно в CpG-динуклеотидах и осуществляется несколькими ферментами, имеющими общее название «ДНК-метилтрансферазы». Более 70 % этих динуклеотидов в геноме позвоночных содержат 5-метилцитозин (5mC). Степень метилирования варьирует в зависимости от типа клетки и от этапа развития. Среднее содержание 5mC в геноме не превышает 1 %. Это обусловлено тем, что CpG-динуклеотиды встречаются в 5 раз реже ожидаемого. Как правило, метилированный цитозин с высокой скоростью путем спонтанной реакции дезаминирования превращается в тимин. Именно это считается основной причиной дефицита CpG-динуклеотидов в геноме и, соответственно, увеличения содержания TpG и CpA динуклеотидов (Bird, 2002; Xing et al., 2004). Превращение цитозина в тимин может приводить к возникновению новых сайтов связывания транскрипционных факторов (ССТФ), что, в свою очередь, может привести к изменению генной экспрессии (Laperriere et al., 2007). Более 20% последовательности Alu-повторов составляют CpG-динуклеотиды. Это приводит к тому, что около 30% всех 5mC в геноме человека приходится на Alu-повторы (Bird, 2002).

Несмотря на пониженное содержание CpG-динуклеотидов, в геноме позвоночных имеются районы, называемые CpG-островками, где их плотность относительно высока. CpG-островком считается последовательность длиной не менее 200 н.п. с содержанием GC>50 %. При этом отношение наблюдаемого числа CpG-динуклеотидов к ожидаемому должно быть не меньше чем 0,6 (Gardiner-Garden, Formmer, 1987). Наиболее часто такие последовательности локализуются в промоторной области генов и первом экзоне, хотя иногда встречаются и в других участках генов.

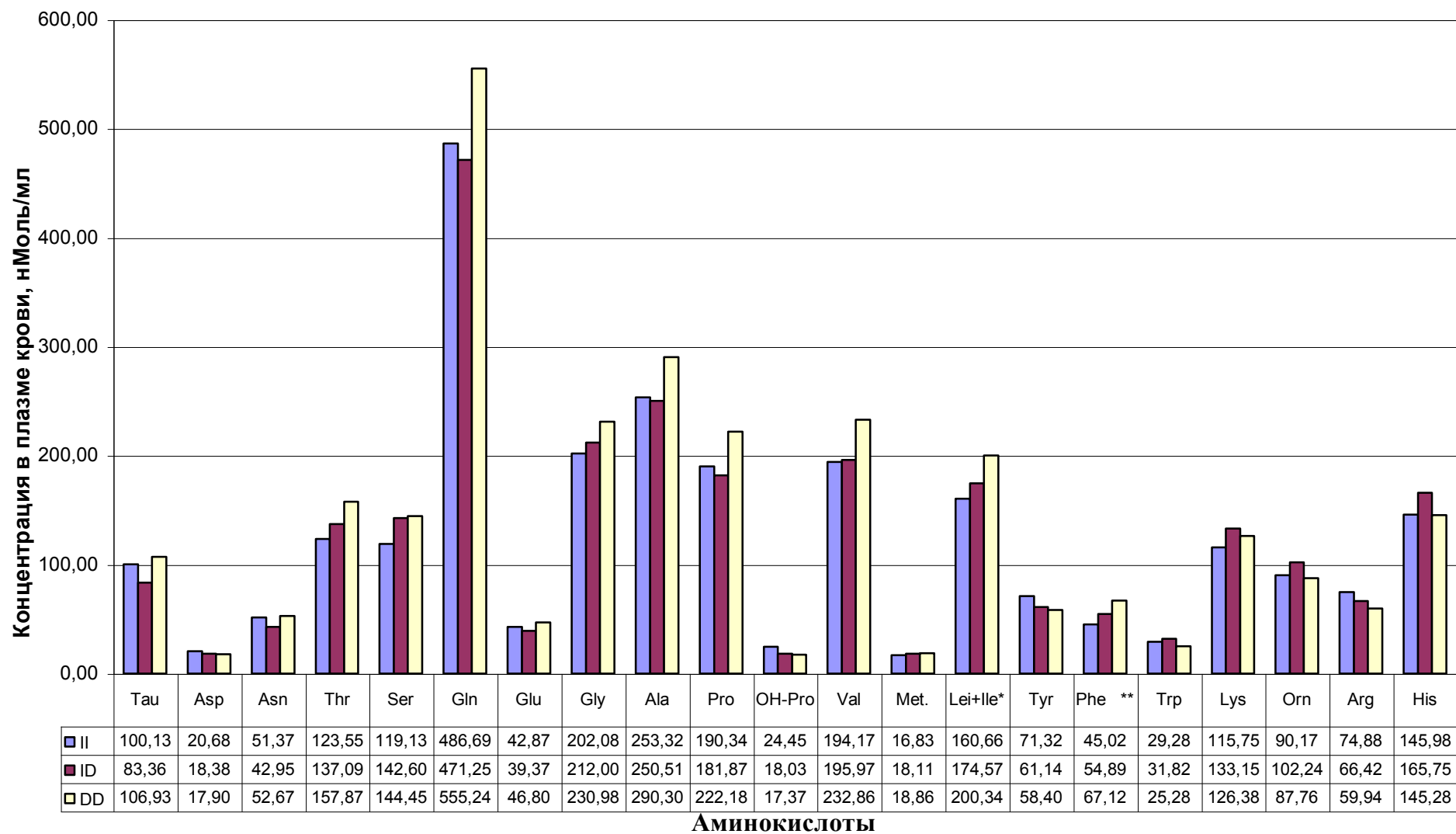


Рисунок 3. Гистограмма распределения среднего значения уровня свободных аминокислот в плазме крови людей в зависимости от генотипа, *P = 0,03, **P = 0,004.

У человека около 70 % промоторов содержит CpG-островки. Основным свойством CpG-островков является то, что большинство из них остается в неметилированном состоянии. Оставшаяся часть островков метилируется в ходе развития и, когда это происходит, экспрессия соответствующего гена полностью подавляется. Считается, что метилирование CpG-островков приводит к подавлению транскрипции за счет ограничения доступности промотора для транскрипционной машинерии после взаимодействия метилированной ДНК с особыми белками или за счет особой укладки такой ДНК в хроматин. Таким образом, Alu-повторы, содержащие большое число потенциальных сайтов метилирования, при ретропозиции в те или иные участки генома могут изменить статус метилирования этих участков и повлиять на уровень экспрессии генов.

Мы *in silico* сравнили частоту встречаемости ССТФ для 10 известных факторов транскрипции в Alu-повторах, мРНК, и промоторах, а также плотность CpG-островков в Alu-повторах и промоторах. Консенсусные последовательности этих ССТФ представлены в таблице 1.

Таблица 1. Консенсусные сайты связывания для некоторых транскрипционных факторов

Транскрипционный фактор	Консенсусный сайт связывания	Транскрипционный фактор	Консенсусный сайт связывания
AP-2	CCCMNSSS	bHLH	CACGTG
SIF	CCCGTM	AP-1	TGASTMA
SP-1	GCGGG	MER-1	TGCRNC
LyF-1	YYTGGGAGR	PPAR	AGGTCA
GATA-3	WGATAR	URFT	TGAGGTCA

Частота встречаемости ССТФ во всех последовательностях была выражена как число сайтов на килобазу (ССТФ/кб). В сравнительном плане была рассчитана плотность для случайной последовательности нуклеотидов. Большинство мРНК имеют низкую плотность ССТФ/кб. Значительным является и различие в средней плотности ССТФ. Она выше в Alu-повторах, чем в мРНК. Если проанализировать не все, а только самые распространенные транскрипционные факторы, то полученный результат будет таким же, как и при использовании полного набора факторов, представленного в таблице 1, а именно: частота встречаемости ССТФ статистически достоверно выше в Alu-повторах, чем в мРНК. Далее было проведено сравнение концентрации ССТФ в Alu-повторах и в промоторах.

Средняя плотность ССТФ/кб. значимо не отличается в Alu-повторах и промоторах, но распределение ССТФ в промоторах очень асимметрично и является мультимодальным с усредненными значениями модальных классов, равными приблизительно 10, 20, 27 и 35 ССТФ/кб. Медиана первой моды приближается к средней величине ССТФ/кб. для мРНК, но статистическое сравнение полного мультимодального распределения ССТФ в промоторах и

мРНК показало увеличение концентрации ССТФ в промоторах как по сравнению с мРНК, так и по сравнению с консенсусной последовательностью Alu-повторов.

Как известно, промоторы позвоночных гетерогенны по содержанию CpG-островков. Промоторы генов тканеспецифических белков относительно богаты CpG-островками, в то время как другие гены могут иметь плотность CpG-островков, соответствующую таковой для случайной ДНК с 50 %-ным содержанием GC-пар (60 CpG/кб.). Плотность CpG-островков может коррелировать или не коррелировать с содержанием GC-пар. Поэтому была исследована плотность CpG-островков и содержание GC-пар в последовательностях Alu-повторов и промоторов. Как и предполагалось, многие промоторы имеют высокую корреляцию между плотностью CpG-островков и содержанием GC-пар, хотя выделяется группа промоторов, плотность CpG-островков в которой всегда низка, независимо от содержания GC-пар. Большинство Alu-повторов содержат более 54 % GC-пар и являются довольно гомогенными по содержанию CpG-островков (средняя плотность меньше 30 CpG/кб.), что никак не коррелирует с содержанием в них ССТФ. Промоторы являются очень вариабельными по содержанию CpG-островков, но их плотность хорошо коррелирует с содержанием ССТФ.

Подгруппа CpG-бедных промоторов, характеризующаяся также низкой плотностью ССТФ, была представлена промоторами генов, кодирующих тканеспецифические белки. Эти промоторы не зависят от факторов транскрипции, использованных в работе. Подгруппа CpG-богатых промоторов, представленная промоторами генов "домашнего хозяйства" (housekeeping), и некоторыми промоторами генов, кодирующих тканеспецифические белки, имела высокую плотность ССТФ. Это говорит о том, что использованные нами последовательности ССТФ являются информативными для довольно большой группы промоторов. Третья подгруппа промоторов характеризуется умеренным содержанием CpG-островков и ССТФ. Промоторы этой группы по содержанию указанных элементов похожи на Alu-повторы и могут быть выделены в подгруппу Alu-подобных промоторов, и эта подгруппа так же хорошо, как и собственно Alu-повторы, отличается от выбранного пула мРНК по плотности ССТФ, если учесть, что концентрация 15-25 ССТФ/кб. является еще информативной для последовательностей промоторов. В результате проведенного анализа установлено, что Alu-повторы основного (мажорного) класса по содержанию CpG-островков и ССТФ сходны с одной из подгрупп человеческих промоторов.

Плотность ССТФ в консенсусной последовательности Alu-повторов (20 ССТФ/кб.) выше, чем в фиксированных геномных Alu-повторах (16 ССТФ/кб.). Это говорит о том, что у многих Alu-повторов, отличающихся от консенсусной последовательности, потенциал модуляции транскрипции после инсерции и фиксации в геноме в основном снижается. Однако встречаются

и Alu-повторы у которых плотность ССТФ больше, чем 20 ССТФ/кб.; следовательно, дивергенция Alu-повторов может сопровождаться увеличением плотности ССТФ и, как следствие, увеличением потенциала модуляции транскрипции. Инсерция Alu-повтора в промотор, имеющий низкую плотность ССТФ, может даже повлиять на тканеспецифичность экспрессии этого гена (**Kazakov V.I.**, Tomilin N.V., 1996). Это была одна из первых работ, в которых приводилось теоретическое обоснование возможности участия Alu-повторов в регуляции генной экспрессии. Позже нам и другим авторам удалось экспериментально подтвердить связывание транскрипционных факторов Sp1 и YY1 с Alu-повторами (Oei S-L., Babich V.S., **Kazakov V.I.**, Usmanova N.M., Kropotov A.V., Tomilin N.V., 2004)

В 2006 году был проведен анализ восьми главных подсемейств Alu-повторов: AluJo, AluJb, AluSx, AluSz, AluSc, AluSq, AluSp и AluY на предмет наличия в их последовательностях сайтов связывания 410 транскрипционных факторов. В ходе анализа использовались различные критерии отбора факторов. При использовании самых жестких критериев обнаружено наличие в консенсусных последовательностях Alu-повторов 25 ССТФ. Сайты связывания некоторых транскрипционных факторов были обнаружены в консенсусах всех 8 подсемейств (например, Otx 2, PITX2, LyF-1). Большинство потенциальных ССТФ оказалось расположенным в плюс цепи Alu-повтора. Последовательность TGTAATCCC и комплементарная ей последовательность GGGATTACA служат в качестве потенциальных сайтов связывания для пяти транскрипционных факторов, четыре из которых являются гомеодомен-содержащими белками. Наличие этой последовательности характерно для консенсусов всех восьми подсемейств Alu-повторов. При этом она локализуется как в правом, так и в левом мономерах AluS подсемейств (Polak, Domany, 2006). Еще в 1994 году эта последовательность была идентифицирована как один из наиболее консервативных участков Alu-повторов (Britten, 1994). Еще одним участком локализации некоторых ССТФ является богатая аденином вставка, разделяющая правый и левый мономеры Alu-повторов (Polak, Domany, 2006). Экспериментально показано связывание транскрипционных факторов PITX2, Nkx2.5, LyF-1, Gfi-1, LXRE α , ER, RARA, Sp1, LUN1, PAX 6, YY1 с Alu-ассоциированными сайтами связывания.

Однако, функциональное значение изолированных ССТФ не совсем ясно, поскольку такие сайты встречаются по всему геному, даже в экзонах. Большинство из них может не иметь никакого значения для регуляции экспрессии генов. Однако кластеризация (как в промоторной области, так и вне ее) потенциальных сайтов связывания функционально близких транскрипционных факторов должна играть важную роль в регуляции экспрессии генов. Такие кластеры получили название *цис*-регуляторных модулей (ЦРМ). В том числе ЦРМ встречаются и в составе Alu-повторов.

Мы предложили принцип обнаружения функциональных Alu-повторов. Он основан на поиске в промоторах генов CpG-островков и ЦPM, а не единичных ССТФ, перекрывающихся с Alu-повтором. Наличие перекрывающихся с Alu-повторами CpG-островков и ЦPM, значительно повышает вероятность того, что данный Alu-повтор выполняет регуляторную роль. При этом мы применяли подход, рассматривающий ЦPM как кластер ССТФ Sp1, ER α , YY1.

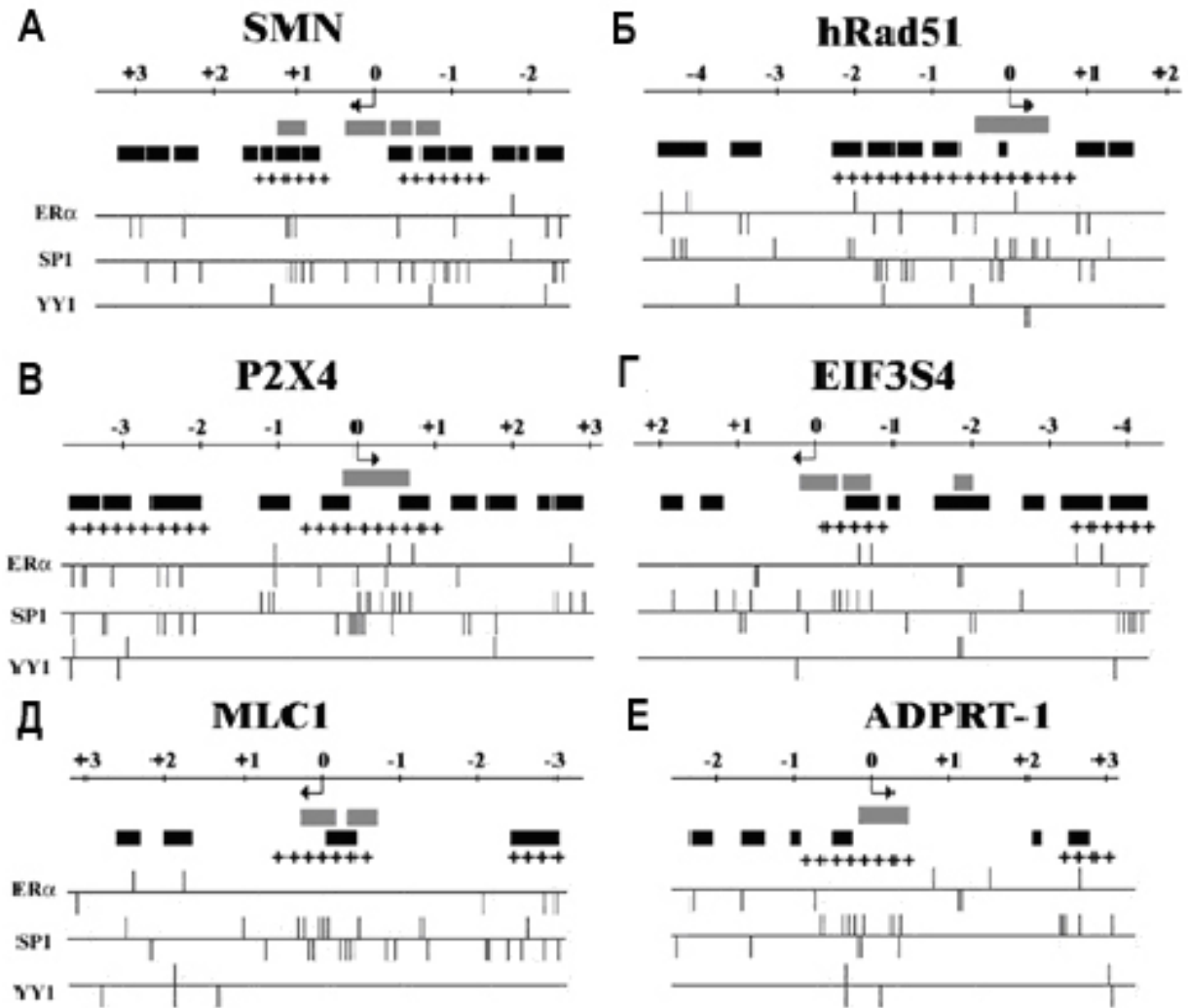


Рисунок 4. Примеры промоторов генов, содержащих в своих проксимальных участках ЦPM, перекрывающиеся с CpG-островками и Alu-повторами: А – ген выживаемости мотонейронов (*SMN*), Б – ген человеческого гомолога белка Rad51 дрожжей (*hRad51*), В – ген субъединицы 4 пуриnergического рецептора (*P2X4*), Г – ген субъединицы IV третьего фактора инициации трансляции эукариот (*EIF3S4*), Д – ген, ассоциированный с многоочаговой лейкоэнцефалопатией (*MLC1*), Е – ген поли(АДФ-рибоза)полимеразы 1 (*ADPRT1*). Стрелкой отмечены точка инициации транскрипции и ее направление, серыми прямоугольниками – CpG-островки, черными – Alu-повторы. Вертикальные столбики над горизонтальными линиями и под ними означают положение сайтов связывания соответствующих транскрипционных факторов. Знаком плюс отмечены ЦPM.

Количество Alu-ассоциированных CpG-островков среди всех промоторов составляет, приблизительно, 4%. В геноме человека содержится около 37°300 белок-кодирующих генов; следовательно, примерно 1400 генов могут содержать Alu-ассоциированные CpG-островки.

Нас интересовали только промоторы, которые содержат в своем проксимальном сегменте Alu-повторы, перекрывающиеся с CpG-островками и ЦРМ. Примеры промоторов, удовлетворяющих этим требованиям, приведены на рис. 4.

Нами были идентифицированы три промотера, содержащие перекрывающиеся с Alu-повторами CpG-островки и потенциальные сайты связывания ER α , которые могут индуцироваться или подавляться эстрадиолом. Ими оказались промоторы генов лизосомной дезоксирибонуклеазы II (*DNAse II*), субъединицы В сукцинатдегидрогеназного комплекса (*SDHB*) и одного из белков немедленного раннего ответа (*HSPC039*).

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что многие ЦРМ ССТФ Sp1, ER α и YY1 ассоциированы с Alu-повторами. Часть из этих повторов перекрывается с CpG-островками. Таким образом, можно сделать вывод, что Alu-ассоциированные ССТФ способствуют формированию в ходе эволюции регуляторных элементов в некоторых человеческих генах. Среди Alu-повторов, перекрывающихся с CpG-островками, в человеческих промоторах присутствует относительно высокая фракция членов эволюционно старых подсемейств Alu. Это согласуется с той точкой зрения, что важные сайты связывания, а, следовательно, и регуляторные функции Alu-повторы приобрели в ходе вторичных мутаций, возникших гораздо позже их инсерции в промоторную область генов. Не вызывает сомнений, что мутации могут приводить к возникновению ССТФ в любых последовательностях, однако это требует очень длительного накопления небольших изменений в последовательности ДНК, что делает спонтанное формирование ЦРМ маловероятным событием. В противоположность этому, Alu-повторы содержат в своей последовательности уже сформировавшиеся ССТФ или даже ЦРМ. Поэтому они могут выполнять свои функции непосредственно после инсерции в промоторную область гена или после накопления относительно небольшого числа мутаций. Дальнейший филогенетический анализ Alu-ассоциированных CpG-островков в геномах приматов может оказаться полезным при выяснении их роли в эволюции (Oei S-L., Babich V.S., **Kazakov V.I.**, Usmanova N.M., Kropotov A.V., Tomilin N.V., 2004).

Взгляд на ЦРМ как на кластер, содержащий достаточное число ССТФ, превышающее некоторое критическое значение, хорошо согласуется с точкой зрения, утверждающей, что инициация транскрипции – это стохастический процесс с высоким порогом и низкой вероятностью этого события даже в точно установленных промоторных областях (Kimura et al., 2002). Следовательно, даже небольшие отклонения плотности сайтов связывания в промоторах могут привести к возникновению новых ЦРМ, что может оказаться принципиальным для эволюции. Плотность ССТФ может возрастать как в результате накопления случайных мутаций, так и в результате инсерций мобильных элементов, содержащих кластеры регуляторных

элементов. Инсерция или делеция коротких последовательностей также могут значительно облегчить формирование ЦРМ и, следовательно, увеличить скорость адаптивной реорганизации промотора.

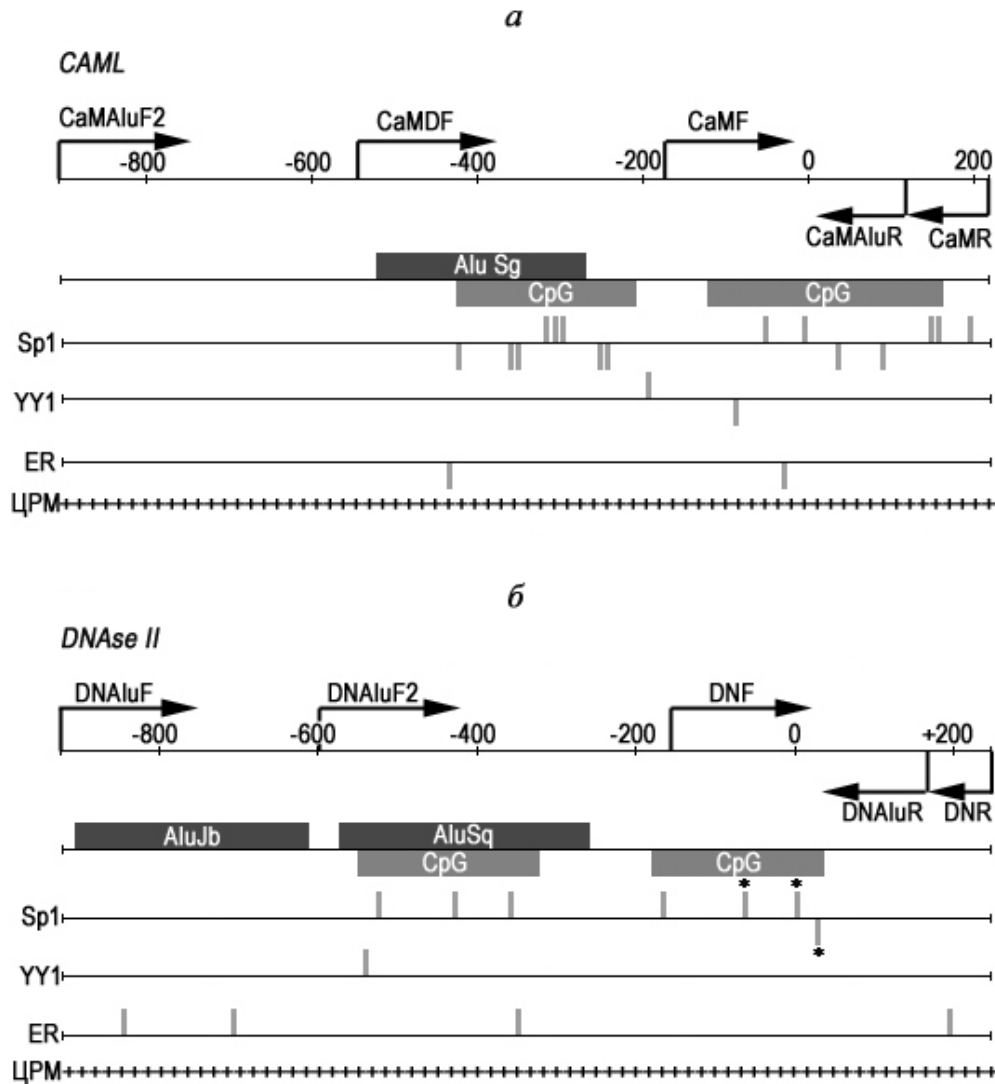


Рисунок. 5 Схема строения промоторов генов *CAML* (а) и *DNase II* (б) и расположения олигонуклеотидных праймеров, используемых в ПЦР. Sp1, YY1, ER – сайты связывания транскрипционных факторов Sp1, YY1, ER α соответственно; ЦРМ – *cis*-регуляторный модуль; CaMAluF2, CaMDF, CaMF, DNAluF, DNAluF2, DNF – прямые олигонуклеотидные праймеры, CaMAluR, CaMR, DNAluR, DNR – обратные олигонуклеотидные праймеры; CpG – CpG-островки; AluSg, AluJb, AluSq – Alu-повторы различных подсемейств. Ноль на оси соответствует точке инициации транскрипции. Звездочками отмечены сайты связывания Sp1, функциональная значимость которых была доказана экспериментально.

В качестве моделей для дальнейшего исследования функциональной роли Alu-повторов в промоторах мы выбрали промоторы двух генов: дезоксирибонуклеазы II (*DNase II*) и лиганда циклофилина, регулирующего кальциевый ответ (*CAML*). Они удовлетворяют всем установленным нами критериям: содержат в своем проксимальном сегменте Alu-элементы, перекрывающиеся с CpG-островками и ЦРМ.

Оба гена содержат в проксимальном сегменте промотора (в районе $-500/+100$ относительно точки инициации транскрипции) Alu-повторы, перекрывающиеся с CpG-островками и ЦРМ. ЦРМ представляет собой кластер ССТФ YY1, Sp1 и ER α . Помимо этого в дистальном сегменте гена *DNase II* имеется AluJb-повтор. Мы обнаружили, что содержание Alu-повторов в проксимальных сегментах промотора примерно на 10 % ниже, чем в остальном геноме. Это можно объяснить тем, что данные районы обогащены сайтами связывания для факторов инициации транскрипции, и Alu-повторы, находящиеся в данных районах, подвержены негативной селекции. Этот факт еще больше доказывает функциональную значимость тех Alu-повторов, инсерция которых произошла в проксимальный сегмент промотора.

Вероятно, инсерция Alu-повторов в промоторы генов *CAML* и *DNase II* произошла до дивергенции архантропов и высших обезьян, так как они содержатся в гомологичных локусах шимпанзе (*Pan troglodytes*) и макаки-резуса (*Macaca mulatta*).

Исследования промотора гена *CAML* показали, что AluSg-повтор, находящийся в районе $-526/-271$, ослабляет экспрессию гена как в клетках линии A549, так и в клетках линии HEK293. Это может быть связано с тем, что на участке $+116/+215$ расположены два ССТФ Sp1 или же сайты связывания других транскрипционных факторов, которые мы не рассматривали в настоящей работе. Исследования промотора гена *DNase II* показали, что AluSq-повтор, находящийся в проксимальном сегменте, ослабляет, а AluJb-повтор, локализованный в дистальном сегменте, усиливает экспрессию гена. С AluJb-повтором перекрываются два ССТФ Egr α . Наши результаты свидетельствуют о том, что Alu-повторы в составе промоторов генов *CAML* и *DNase II* обладают активностью в клетках линии A549 и HEK293 (Усманова Н.М., Казаков В.И., Томилин Н.В., 2008а).

Возможно, в клетках других типов Alu-повторы, находящиеся в промоторах генов *CAML* и *DNase II*, обладают прямо противоположной активностью или не имеют таковой вовсе. Необходимо отметить, что экспрессия обоих генов осуществляется во всех тканях человека. Можно сделать предположение, что негативные Alu-ассоциированные элементы в промоторах этих генов не работают в тех тканях, где гены экспрессируются на высоком уровне.

Для гена паратиреоидного гормона было показано, что негативный кальций-чувствительный элемент 2-го типа (nCARE2) расположен в Alu-повторе, который находится на

3,6 килобазы вверх по течению от точки инициации транскрипции (Hamdi et al., 2000). Таким образом, Alu-повторы могут выполнять регуляторную функцию, находясь за несколько килобаз от точки инициации транскрипции. Область -5000/0 гена *DNase II* содержит еще 3 Alu-повтора, помимо тех, которые указаны на рис. 5. Область -5000/0 гена *CAML* содержит еще 6 полноразмерных и 7 частично делетированных Alu-повторов. Интроны указанных генов также содержат многочисленные Alu-элементы. Вполне вероятно, что указанные последовательности также участвуют в регуляции экспрессии этих генов. Белки, кодируемые генами *DNase II* и *CAML*, вовлечены во многие метаболические процессы. Так, дезоксирибонуклеаза II играет важную роль в процессах апоптоза и эритропоэза, а лиганд циклофилина участвует в раннем иммунном ответе и некоторых других сигнальных путях.

Если сравнивать промоторы генов *DNase II* и *CAML* человека и обезьян (шимпанзе и макаки-резуса), то несложно заметить, что число ССТФ, ассоциированных с Alu-повторами, неодинаково у разных видов. У человека ЦРМ полностью перекрываются с промоторами, в то время как у обезьян число ССТФ меньше критического значения. Возможно, данные гены регулируются посредством Alu-повторов иным образом или не регулируются вовсе. Однако этот вопрос требует дальнейших исследований. На данном примере видно, что за счет случайных мутаций с течением времени может происходить формирование ЦРМ. Изначальное наличие в промоторах Alu-повторов, перекрывающихся с ССТФ, ускоряет этот процесс.

Таким образом, полученные результаты подтверждают выдвинутую нами гипотезу о функционировании Alu-повтора, перекрывающегося с CpG-островком и ЦРМ, в качестве регуляторного элемента.

В предыдущих разделах описана огромная роль ИДП AluYa5-повтора в гене *ACE*. Многочисленные ассоциации с различными патологиями и функциональными особенностями организма делают этот ИДП особенно значимым. Объяснение всех этих ассоциаций основано на том факте, что у инсерционных гомозигот уровень АПФ в плазме крови вдвое ниже, чем у делеционных гомозигот. На основании того, что Alu-повтор локализован в интроне, многие исследователи считают маловероятной возможность его непосредственного участия в регуляции экспрессии гена. В большинстве случаев они склоняются к мысли, что Alu-повтор находится в неравновесном сцеплении с другими полиморфизмами. Однако поиски таких функциональных полиморфизмов пока что не увенчались успехом. Мы полагаем, что в случае гена *ACE* инсерция AluYa5-повтора в его 16-й интрон привела к возникновению транскрипционного сайленсера.

Примерами регуляторных элементов, локализованных в интронах генов, могут выступать Alu-ассоциированный энхансер, расположенный в 5-м интроне гена *CD8*, Alu-ассоциированный транскрипционный сайленсер в 3-м интроне гена-супрессора опухоли Вильмса. Примеры

негативной регуляции экспрессии генов транскрипционными факторами YY1 и ER α и Sp1 также хорошо известны.

В составе 16-го интрона гена *ACE* нами был обнаружен Alu-ассоциированный *cis*-регуляторный модуль, содержащий ЦРМ (кластер ССТФ Sp1, YY1, ER α), перекрывающийся с двумя Alu-повторами и Alu-ассоциированным CpG-островком (Oei S-L., Babich V.S., Kazakov V.I., Usmanova N.M., Kropotov A.V., Tomilin N.V., 2004) (см. рис. 6).

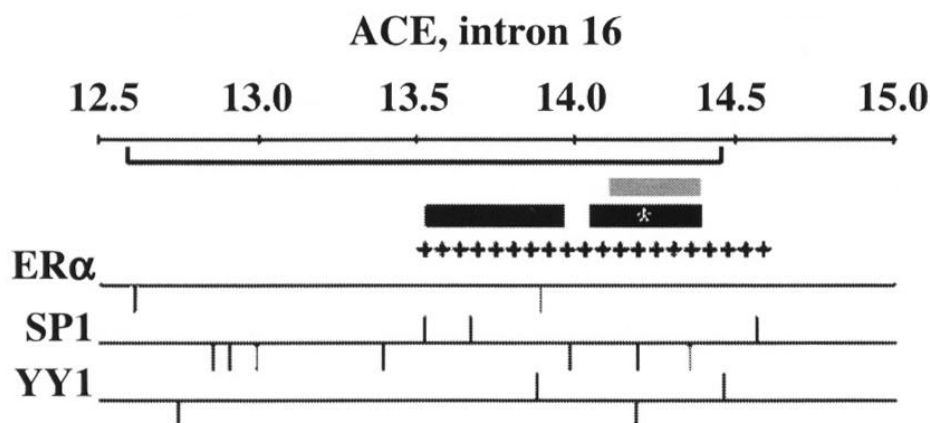


Рис. 6. ЦРМ в составе 16-го интрона гена *ACE*. Звездочкой обозначен AluYa5-повтор, серым цветом – CpG-островок, плюсами – ЦРМ. Цифрами обозначено расстояние в килобазах от точки инициации транскрипции.

Alu-повторы могут служить вспомогательными сигналами при формировании факультативного гетерохроматина. При помощи методов компьютерного анализа мы сравнили распределения генов, SINE и L1 повторов, а также CpG-островков в X хромосомах человека и мыши. Последовательности хромосом были взяты из базы данных Ensembl v.44. Эти распределения сходны для Alu-повторов и CpG-островков в X хромосоме человека, в то время как распределение L1-повторов отличается от распределения Alu-повторов и CpG-островков. L1-повторы преимущественно группируются в районах с низкой плотностью Alu-повторов и CpG-островков. Кластеры Alu-повторов и CpG-островков перекрываются с кластерами известных и предсказанных генов, представленных в базе данных Ensembl v.44, и районами, обогащенными гистоном H3 – K27m3 в инактивированной X хромосоме. Повторы B1 и B2 – B4 мыши имеют распределения, подобные распределению CpG-островков, но отличные от распределения L1-повторов. Помимо этого оказалось, что распределения SINE повторов и CpG-островков также перекрываются с распределением генов и с указанным в литературных источниках распределением Xist РНК в хромосомах на поздних стадиях митоза (Усманова Н. М., Казаков В. И., Томилин Н. В., 2008б).

Согласно существующей модели инактивации X хромосомы, в ней имеются некие вспомогательные элементы («way station» или «boosters»), которые облегчают распространение сигнала вдоль хромосомы. В многочисленных работах было показано, что распространение инактивации возможно и на аутосомные участки в X/аутосомных транслокациях. В связи с этим возникло предположение, что вспомогательные элементы имеются и в аутосомах, но в меньшем количестве. В районах же, избегающих инактивации, как в аутосомах, так и в X хромосоме, они почти отсутствуют. В 1998 году была выдвинута гипотеза, предполагающая, что подобными «way station» являются LINE повторы, в частности, L1-повторы мыши и человека (Lyon, 1998). Мы полагаем, что не L1, а Alu-повторы человека и SINE повторы у мышей служат дополнительными сигналами глушения транскрипции в ген-содержащих районах X хромосомы в процессе ее инактивации по пути, зависящем от белкового комплекса Polycomb. X хромосомы мыши и человека, по сравнению с аутосомами, обогащены L1-повторами. Содержание Alu-повторов в X хромосоме человека достаточно низкое, но наблюдается повышенная плотность Alu-повторов молодых подсемейств. После полного секвенирования геномов мыши и человека стало возможным говорить о конкретных численных характеристиках. Соотношение содержания L1-повторов в X хромосоме и в среднем в аутосомах составляет у человека 29% к 17% , у мыши 28,5% к 14,6 % (Waterston et al., 2002). У человека плотность L1-повторов максимальна в XIC участке и уменьшается по обе стороны от него (Bailey et al., 2000). В XIC районе мыши содержание L1-повторов даже несколько ниже (примерно на 2%), чем в среднем по X хромосоме (Chureau et al., 2002).

В районе Xp11.2 человека локализован один из кластеров генов, избегающих инактивации. В синтеничном районе X хромосомы мыши только один ген избегает инактивации: *Smcx*, в то время как остальные гены инактивированы. Согласно модели вспомогательных элементов, в районах, избегающих инактивации, должно наблюдаться пониженное количество таких элементов. При сравнении распределений повторяющихся элементов в этих районах оказалось, что пониженное содержание L1-повторов наблюдается только в районе *SMCX/Smcx*. С другой стороны, SINE повторы обнаруживали повышенное содержание в данном районе у обоих видов, несмотря на то, что у мыши только один ген в этом районе избегает инактивации (Tsuchiya et al., 2004).

В 2005 году был получен полный профиль экспрессии генов в инактивированной X хромосоме человека (Carrel, Willard, 2005). Это открыло новые возможности в изучении механизмов инактивации. Сравнительный анализ окружения генов, локализованных в районе Xp22 (до 250 килобаз в обе стороны от точки инициации транскрипции), позволил выявить различия в содержании некоторых олигомеров в генах, подвергающихся и избегающих

инактивации. Было показано, что 64% додекамеров, содержание которых повышено в окружении инактивированных генов, являются частью L1-повторов, а 38 % додекамеров, содержание которых повышено в окружении генов, избегающих инактивации, – частью Alu-повторов. При этом некоторое количество олигомеров, локализованных в L1-повторах, встречается значительно чаще в окружении генов, избегающих инактивации (4%). Точно так же 9% олигомеров, принадлежащих Alu-повторам, преобладают в окружении инактивированных генов (Carrel et al., 2006).

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что распределение SINE повторов, но не L1-повторов, сходно с распределением таких важных признаков факультативного гетерохроматина в X хромосоме, как Xist РНК и H3-K27m3. Помимо этого, распределение CpG-островков подобно распределению SINE повторов (Усманова Н.М., Казаков В.И., Томили Н.В., 2008б). Метилирование CpG-островков, локализованных в промоторах, также является одним из признаков гетерохроматина. Промоторы X-ассоциированных генов домашнего хозяйства гиперметилированы в инактивированной и гипометилированы в активной X хромосоме. Промоторы гиперметилируются через несколько дней после инициации инактивации X хромосомы. Существует несколько доказательств того, что ДНК-метилирование необходимо для поддержания неактивного состояния. Так, добавление в среду культуры клеток ингибиторов ДНК-метилтрансфераз, таких как 5-азациитидин, приводит к реактивации некоторых X-ассоциированных генов, хотя и не очень часто. Тот же результат наблюдается в случае отсутствия ДНК метилтрансфераз Dnmt1 и Dnmt3b (Hansen et al., 2000; Csankovszki et al., 2001).

Белки группы Polycomb (PcG) играют важную роль в инактивации X хромосомы. Субъединица EED комплекса PRC2 (Polycomb repressive complex 2) осуществляет метилирование гистона H3 по лизину в 27-м положении, а белок Ring1A/B комплекса PRC1 осуществляет убиквитинилирование гистона H2A (Moss, Wallrath, 2007; Ng et al., 2007). Известно, что распределение гистона H2A-K119ub1 у мыши совпадает с распределением богатых генами сегментов, а также с распределением Xist РНК (Smith et al., 2004). Поскольку распределение Alu-повторов в геноме человека и SINE повторов в геноме мыши оказалось сходным с распределением перечисленных выше маркеров гетерохроматина, мы полагаем, что SINE повторы могут играть важную роль в Polycomb-зависимом глушении генов.

Авторы, придерживающиеся гипотезы о том, что L1-повторы являются вспомогательными сигналами при формировании факультативного гетерохроматина, не предлагают объяснений того, каким именно образом происходит взаимодействие белков группы PcG с L1-повторами. Мы считаем, что такое взаимодействие с Alu-повторами человека и Alu-подобными повторами у мыши может осуществляться за счет связывания белков группы PcG с

ССТФ YY1. Белок YY1, единственный из всей группы PcG, способен специфически связываться с последовательностью ДНК. Кроме того, он является гомологом белка pleiohomeotic (PHO) *Drosophila melanogaster*, который связывается с Polycomb-чувствительными элементами в последовательности ДНК (Polycomb response elements) и подавляет транскрипцию генов в ходе эмбриогенеза. ДНК-связывающие домены YY1 и его гомологов весьма консервативны в ряду дрозофила – человек. Взаимодействие YY1 с белком EED PRC2 комплекса было показано у *Xenopus laevis* (Satijn et al., 2001). Кроме того, было показано непосредственное связывание YY1 с ДНК с последующим привлечением белков группы PcG (Wilkinson et al., 2006).

Ранее упоминалось о том, что ССТФ YY1 присутствует в консенсусной последовательности Alu-повтора. Кроме того, непосредственное связывание YY1 с Alu-повторами было доказано экспериментально. Мы проанализировали распределение потенциальных ССТФ YY1 в X хромосоме и сопоставили его с распределением Alu-повторов. Мы обнаружили, что распределение Alu-повторов (но не L1-повторов) строго коррелирует с распределением ССТФ YY1, то есть большое число Alu-повторов, локализованных в X хромосоме, могут связывать YY1

Мотив СС₂ATSTTGNC, который является консенсусной последовательностью ССТФ YY1 у человека, не обнаруживает корреляции с SINE повторами мыши. Возможно, что ССТФ YY1 у мыши слегка отличается от такового у человека. Консенсусная последовательность B2-элементов у мыши содержит мотив GCCATCTCACC, который, вероятно, и является сайтом связывания YY1 у мышей, что, однако, требует экспериментального подтверждения. (Усманова Н. М., Казаков В. И., Томилин Н. В., 2008б).

Инвертированные повторы встречаются в геноме амфибий.

Принцип получения интер-Alu-фрагментов оказался применим и к повторам других эукариотических организмов. Так, при использовании метода однопраймерной ПЦР с олигонуклеотидами, гомологичными наиболее консервативной части сателлита TkS1, образуются дискретные фрагменты ДНК, фланкированные лежащими вне кластера инвертированными повторами. Такие фрагменты обнаружены в геномах следующих видов и подвидов хвостатых амфибий семейства Salamandridae – *Pleurodeles waltl*, *Triturus alpestris alpestris*, *Triturus vulgaris lantzi*, *Triturus vulgaris vulgaris*, *Neurergus crocatus* и *Triturus vulgaris graecus* (Литвинчук С.Н., Лашина О.С., Казаков В.И., 2004). Геном хвостатых амфибий отличается рекордными размерами, а количество копий сателлита TkS1 у некоторых видов может достигать 120 млн. копий на диплоидный геном, что составляет около 10% от всего генома. До наших работ считалось, что TkS1-повторы являются типичной, организованной в

протяженные кластеры сателлитной ДНК. Такое мнение сложилось в результате использования методик рестрикционного анализа тотальной ДНК. При этом дискретная картина наблюдается только в случае, если повторы организованы в кластеры и между ними нет вставок посторонней ДНК. При таком методе анализа генома невозможно обнаружить повторы, находящиеся вне кластера. При использовании метода однопраймерной ПЦР образуются дискретные фрагменты ДНК, фланкированные лежащими вне кластера инвертированными повторами. Следовательно, по крайней мере, у *Pleurodeles waltl*, *Triturus alpestris alpestris*, *Triturus vulgaris lantzi*, *Triturus vulgaris vulgaris*, *Neurergus crocatus* и *Triturus vulgaris graecus* присутствует некоторое количество TкS1 повторов, не имеющих кластерной организации (Литвинчук С.Н., Лашина О.С., Казаков В.И., 2004). Позже продукты ПЦР были клонированы в плазмиде XL-Blue и секвенированы. Результаты секвенирования показали, что в геноме восьми подвидов тритона обыкновенного *Lissotriton vulgaris* расходящиеся инвертированные TкS1-повторы фланкируют некодирующие последовательности ДНК, возможно, минисателлиты. Эти последовательности депонированы в базе данных GenBank.

Таблица 2. Последовательности *Lissotriton vulgaris* (L.v.), фланкированные расходящимися инвертированными TкS1-повторами.

Подвид	Количество клонов	Номер в базе данных GenBank
L. v. meridionalis	15	JQ343957.1, JQ343955.1, JQ343953.1, JQ343951.1, JQ343949.1, JQ343947.1, JQ343945.1, JQ343958.1, JQ343956.1, JQ343954.1, JQ343952.1, JQ343950.1, JQ343948.1, JQ343946.1, JQ343944.1
L. v. lantzi	15	JQ320490.1, JQ320488.1, JQ320486.1, JQ320484.1, JQ320482.1, JQ320480.1, JQ320478.1, JQ320476.1, JQ320489.1, JQ320487.1, JQ320485.1, JQ320483.1, JQ320481.1, JQ320479.1, JQ320477.1
L. v. graecus	14	JQ320474.1, JQ320472.1, JQ320470.1, JQ320468.1, JQ320466.1, JQ320464.1, JQ320462.1, JQ320475.1, JQ320473.1, JQ320471.1, JQ320469.1, JQ320467.1, JQ320465.1, JQ320463.1
L. v. vulgaris	14	JQ320448.1, JQ320446.1, JQ320444.1, JQ320442.1, JQ320440.1, JQ320438.1, JQ320436.1, JQ320447.1, JQ320445.1, JQ320443.1, JQ320441.1, JQ320439.1, JQ320437.1, JQ320435.1
L. v. schmidtlerorum	14	JQ343971.1, JQ343969.1, JQ343967.1, JQ343965.1, JQ343963.1, JQ343961.1, JQ343959.1, JQ343972.1, JQ343970.1, JQ343968.1, JQ343966.1, JQ343964.1, JQ343962.1, JQ343960.1
L. v. ampelensis	13	JQ320460.1, JQ320458.1, JQ320456.1, JQ320454.1, JQ320452.1, JQ320450.1, JQ320461.1, JQ320459.1, JQ320457.1, JQ320455.1, JQ320453.1, JQ320451.1, JQ320449.1,
L. v. schreiberi	9	JQ343981.1, JQ343979.1, JQ343977.1, JQ343975.1, JQ343973.1, JQ343980.1, JQ343978.1, JQ343976.1, JQ343974.1

Выше уже отмечалось, что Alu-повторы могут служить своеобразными маркерами ДНК человека как биологического вида. Здесь необходимо отметить, что Alu-повторы также встречаются и у других представителей Отряда Primates, но у человека все же имеется специфическое только для него эволюционно молодое AluY подсемейство Alu-повторов.

Поиск генетических маркеров для разных видов представляется весьма актуальной задачей, так как может привести в систематику дополнительный критерий вида и уточнить

филогенетические связи между таксонами. Так, нами, у представителей восьми видов зеленых лягушек (*Rana ridibunda*, *Rana cf. bedriagae*, *Rana cretensis*, *Rana esculenta*, *Rana lessonae*, *Rana shquiperica*, *Rana saharica*, *Rana nigromaculata*) обнаружен варибельный по длине микросателлитный повтор BM224, ранее отмечавшийся только у представителей рода *Bufo* (Литвинчук С.Н., Розанов Ю.М., Усманова Н.М., Боркин Л.Я., Мазанаева Л.Ф., Казаков В.И., 2006). Возможно, этот генетический маркер может быть использован для идентификации видов зеленых лягушек (Усманова И. М., Литвинчук С. П., Казакова Е. А., Казаков В. И., 2010).

Подобно Alu-элементам DL1 повторы лентеца широкого (*Diphyllobothrium latum*) содержат внутренний промотор для РНК-полимеразы III. В геноме широко распространенного паразита человека лентеца широкого (*Diphyllobothrium latum*) нами был обнаружен повторяющийся элемент, который мы назвали DL1. Во всем мире дифиллоботриозом страдает около 20 млн. человек (Scholz et al., 2009). Несмотря на большое клиническое значение этого вида до нашей работы ничего не было известно о его ядерном геноме. Секвенированные нами последовательности депонированы в базе данных GenBank под номерами GU350458 и GQ398237. Обнаруженный нами DL1-повтор может быть отнесен к классу SINE повторов, так как имеет некоторые признаки представителей этого класса повторяющихся элементов.

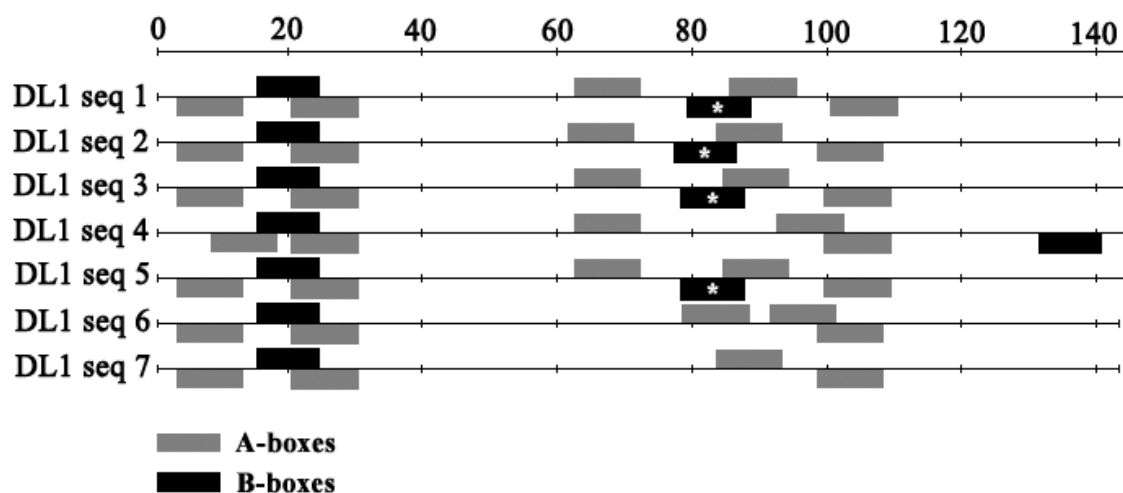


Рисунок 7. Расположение Вох-А и Вох-В в семи копиях DL1 повтора. Прямоугольники выше прямой линии – Вох-А и Вох-В в прямой ориентации; прямоугольники под прямой линией – Вох-А и Вох-В в обратной ориентации. Звездочками отмечены Вох-В, которые могут инициировать транскрипцию DL1 повторов.

SINE повторы являются относительно короткими ретропозонами 80–500 (обычно 150–200) н.п. В большинстве случаев SINE повторы фланкированы короткими (5–15 нуклеотидов) прямыми повторами. Обнаруженный нами повтор DL1 имеет длину 143–145 н.п., его первые восемь нуклеотидов аналогичны восьми последним. Последовательность GQ398237 представляет собой кластер таких повторов. Вполне возможно, что последовательность, следующая после DL1

повтора (GU350458), представляет собой фрагмент гена обратной транскриптазы и DL1-повтор расположен в интроне этого гена. Как известно, обратная транскриптаза играет важную роль в процессе амплификации ретропозонов в геномах. Все известные SINE повторы имеют внутренние промоторы для РНК-полимеразы III, большинство используют промотор, аналогичный таковому Alu-повторов. Компьютерный анализ показал, что в последовательности DL1 повторов содержится несколько Vox-A и Vox-B, аналогичных таковым Alu-повторов.

При проведении компьютерного анализа было разрешено только одно несоответствие с консенсусной последовательностью Vox-A. Если бы мы позволили два несоответствия, значительно увеличилось бы число Vox-A и Vox-B. Кроме того, известно, что делеция Vox-A в Alu-повторе просто снижает эффективность транскрипции в 10–20 раз, а оставшийся Vox-B является необходимым и достаточным для прямой инициации транскрипции. Вполне возможно, что Vox-B, отмеченные звездочками на рис. 7, могут инициировать транскрипцию DL1 повторов РНК-полимеразой III (Usmanova N.M., Kazakov V.I., 2010).

ВЫВОДЫ

1. Alu-повторы являются важными функционально значимыми элементами генома человека, а не «эгоистической ДНК», как это было принято считать ранее.
3. Alu-повторы за счет модуляции экспрессии генов вносят существенный вклад в генетическую гетерогенность популяции.
4. Инсерционно-делеционный полиморфизм AluYa5-повтора в гене ангиотензинпревращающего фермента ассоциирован с высшими достижениями в различных спортивных дисциплинах, уровнем свободных аминокислот в сыворотке крови больных с дисплазиями соединительной ткани, а в сочетании с факторами внешней среды – с развитием дисциркуляторной энцефалопатии.
5. Alu-повторы могут служить вспомогательными сигналами при формировании факультативного гетерохроматина.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. **Казаков В. И.**, Божков В. М., Линде В. А., Репина М. А., Михайлов В. М. 1995. Внеклеточная ДНК в крови беременных женщин. Цитология. 37 (3): 232–236.
2. Светлова М. П., **Казаков В. И.**, Тимченко Д. И., Коршунова Ю. О., Божков В. М., Томилин Н. В. 1995. Физическое картирование хромосом человека. Использование полимеразной цепной реакции на уникальных последовательностях ДНК с известной локализацией в хромосоме 3. Цитология. 37 (8): 813–819.
3. **Казаков В. И.**, Светлова М. П., Бойко В. П., Крутилина Р. И., Зенин В. В., Аксенов Н. Д., Шатрова А. Н., Божков В. М., Томилин Н. В. 1996. Физическое картирование хромосом человека. Получение уникальных хромосомспецифических фрагментов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции с олигонуклеотидными праймерами на консервативные участки Alu-повторов. Цитология. 38 (4/5): 510–516.
4. **Kazakov V.**, Tomilin N. 1996. Increased concentrations of some transcription factor binding sites in human retroposons of the Alu-family. *Genetica*. 97: 15–22.
5. Анацкий С. Ю., **Казаков В. И.**, Божков В. М. 1996. Структура Alu-подобных нуклеотидных последовательностей ДНК у рыбообразных и рыб. Цитология. 38 (12): 1255–1260.
6. Михайлов В. М., **Казаков В. И.**, Комаров С. А., Нилова В. К., Штейн Г. И., Баранов В. С. Апоптоз и деградация ДНК кардиомиоцитов мышей MDX и C57Bl. 1998. Цитология. 40 (5): 401–406.
7. **Казаков В. И.**, Казакова Е. А. 1999. Структура Alu-подобных последовательностей ДНК у некоторых иглокожих. Цитология. 41 (6): 538–540.
8. Rogozkin V. A., Назаров И. Б., **Казаков В. И.** 2000. Генетические маркеры физической работоспособности человека. Теория и практика физической культуры. 12: 34–36.
9. Сафина Н. С., Урманчеева А. Ф., Томилин Н. В., Кришен О. В., Аксёнов Н. Л., **Казаков В. И.**, Кашина Н. О., Арефина Н. В. 2000. Определение показателей липидного обмена и полиморфизма генов апополипротеина AI и ангиотензин-конвертирующего фермента у больных раком тела матки. Вопросы онкологии. 46 (1): 54–57.
10. Коваленко А. Л., **Казаков В. И.**, Слита А. В., Зарубаев В. В., Сухинин В. П. 2000. Исследование внутриклеточной локализации циклоферона, его связывания с ДНК и стимуляция экспрессии цитокинов в клетках при воздействии циклоферона. Цитология. 42 (7): 659–664.
11. **Казаков В. И.**, Михайлов В. М. 2001. Фрагментация ДНК кардиомиоцитов мышей MDX и C57Bl после стресса. Цитология. 43 (1): 72–75.
12. Nazarov I. B., Woods D. R., Montgomery H. E., Shneider O. V., **Kazakov V. I.**, Tomilin N. V., Rogozkin V. A. 2001. The angiotensin converting enzyme I/D polymorphism in Russian athletes. *European Journal of Human Genetics*. 9 (10): 797–801
13. Литвинчук С. Н., **Казаков В. И.**, Анацкий С. Ю. 2002. Музейные коллекции животных в молекулярно-генетических исследованиях. Успехи современной биологии. 122 (5): 444–448.
14. **Казаков В. И.**, Кадурин Т. И., Усманова Н. М., Томилин Н. В. 2003. Влияние инсерционно-делеционного полиморфизма в гене ангиотензинпревращающего фермента на уровень свободных аминокислот в сыворотке крови больных с дисплазиями соединительной ткани. Генетика. 39(8): 1136–1140. Имеется перевод: **Kazakov V. I.**, Kadurina T. I., Usmanova N. M., Tomilin N. V. 2003. Insertion-deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and its relationship to serum levels of free amino acids in the patients with connective tissue dysplasias. *Russian Journal of Genetics*. 39 (8): 955–959.
15. Oei S.-L., Babich V. S., **Kazakov V. I.**, Usmanova N. M., Kropotov A. V., Tomilin N. V. 2004. Clusters of regulatory signals for RNA polymerase II transcription associated with Alu-family repeats and CpG-islands in human promoters. *Genomics*. 83 (5): 873–882.
16. Литвинчук С. Н., Лашина О. С., **Казаков В. И.** 2004. Распределение сателлитной ДНК в геноме хвостатых амфибий. Цитология. 46 (7): 628–633.
17. Литвинчук С. Н., Розанов Ю. М., Усманова Н. М., Боркин Л. Я., Мазанаева Л., **Казаков В. И.**

- Изменчивость микросателлитов *BM224* и *Bcal7* в популяциях зеленых жаб (*Bufo viridis* complex), различающихся по размеру генома и пloidности. 2006. Цитология. 48 (4): 332–345. Имеется перевод: Litvinchuk S. N., Rozanov Yu. M., Usmanova N. M., Borkin L. Ya., Mazanaeva L. F., **Kazakov V. I.** 2007. Variability of Microsatellites *BM224* and *Bcal7* in Populations of Green Toads (*Bufo viridis* Complex) Differing by Nuclear DNA Content and Ploidy. *Cell and Tissue Biology*. 1 (1): 65–79.
18. Усманова Н. М., **Казakov В. И.**, Томилин Н. В. 2008. Ретропозоны *Alu*-семейства из *cis*-регуляторных модулей промоторов генов *DNase II* и *SAML* влияют на генную экспрессию в клетках A549 и HEK293. Цитология. 50 (3): 249–255. Имеется перевод: Usmanova N. M., Kazakov V. I., Tomilin N. V. 2008. Retroposons of *Alu*-family from *cis*-regulatory modules of *DNase II* and *SAML* genes affect gene expression in A549 and HEK 293 cells. *Cell and Tissue Biology*. 2 (5): 457–462.
19. Усманова Н. М., **Казakov В. И.**, Томилин Н. В. 2008. *SINE*-элементы в геномах млекопитающих могут служить вспомогательными сигналами при формировании факультативного гетерохроматина. Цитология. 50 (3): 256–260. Имеется перевод: Usmanova N. M., Kazakov V. I., Tomilin N. V. 2008. SINEs in mammalian genomes can serve as additional signals in formation of facultative heterochromatin. *Cell and Tissue Biology*. 2 (3): 217–221.
20. Kehoe A. D., Nikiforov A. M., Alexanin S. S., Neronov E. G., Tikhomirova O. V., Shun'kov V. B., Makarova N. V., Rabinovich E, Usmanova N. M., **Kazakov V. I.**, Slozina N. M., Montgomery H. E. 2009. Angiotensin-converting enzyme genotype and encephalopathy in Chernobyl cleanup workers. *Eur. J Neurol*. 16 (1): 95–100.
21. Усманова И. М., Литвинчук С. Н., Казакова Е. А., **Казakov В. И.** 2010. Изменчивость микросателлита *BM224* у зеленых лягушек рода *Rana*. Цитология. 52 (10): 858–862. Имеется перевод Usmanova N. M., Litvinchuk S. N., Kazakova E. A., **Kazakov V. I.** 2010. Variations in *BM224* Microsatellite in Green Frogs of Genus *Rana*. *Cell and Tissue Biology*. 4 (5): 436–441.
22. Usmanova N. M., Kazakov V. I. 2010. The *DL1* repeats in the genome of *Diphyllobothrium latum*. *Parasitol Res*. 107 (2): 449–452.

Тезисы

1. Смарагдов М. Г., Захарова Ю. В., Смирнов А. Ф., **Казakov В. И.** Полспецифические последовательности и детерминация пола у млекопитающих. Материалы второй Всесоюзной конференции по цитогенетике сельскохозяйственных животных. Ленинград-Пушкин 1988. 156–157.
2. Томилин Н. В., Божков В. М., Светлова М. П., **Казakov В. И.**, Филатов Л. В., Ермилов А. Н. Использование метода полимеразной цепной реакции для физического картирования генома человека. Тезисы докладов и сообщений Первой Всесоюзной конференции «Геном человека». Переяславль-Залесский 8–12 октября 1990. 32.
3. Tomilin N. V., Bozhkov V. M., Svetlova M. P., **Kazakov V. I.** Distribution of the *Alu*-family DNA repeats in human genome and isolation of chromosome specific probes using *Alu*-*Alu* PCR. Genome analysis from sequence to human DNA. Heidelberg 10–12 December 1990. 28.
4. Томилин Н. В., Божков В. М., Светлова М. П., **Казakov В. И.**, Крутилина Р. И. Получение зондов к уникальным последовательностям ДНК хромосомы 3 человека с помощью ПЦР с *Alu*-праймерами. Тезисы докладов и сообщений Второй Всесоюзной конференции «Геном человека». Переяславль-Залесский 8–12 октября 1991. 58–59.
5. **Казakov В. И.**, Бойко В. П., Горанин К. В., Зенин В. В., Аксёнов Н. Д., Шатрова А. Н., Божков В. М., Томилин Н. В. Амплификация с помощью *Alu*-ПЦР последовательностей ДНК, экспрессируемых в клетках человека. Тезисы докладов и сообщений Третьей Всесоюзной конференции «Геном человека». Черногловка 10–12 марта 1993. 24.
6. **Казakov В. И.**, Бойко В. П., Горанин К. В., Зенин В. В., Аксёнов Н. Д., Божков В. М., Томилин Н. В. Получение хромосомспецифических интер-*Alu*-фрагментов ДНК человека. Тезисы докладов и сообщений третьей Всесоюзной конференции «Геном человека». Черногловка 10–12 марта 1993. 42.

7. Светлова М. П., Тимченко Д. И., **Казаков В. И.**, Божков В. М., Томилин Н. В. Набор олигонуклеотидных ПЦР-праймеров на уникальные последовательности хромосомы 3 человека и его характеристика. Тезисы докладов и сообщений третьей Всесоюзной конференции «Геном человека». Черноголовка 10–12 марта 1993. 165.
8. Анацкий С. Ю., **Казаков В. И.**, Божков В. М. Структура повторяющихся последовательностей ДНК у лососёвых рыб. Материалы 5 Всероссийского совещания «Систематика, биология и биотехнология разведения лососёвых рыб». Санкт-Петербург 1994. 5–8.
9. **Kazakov V.**, Bozkov V., Linde V., Mikhailov V. 1994. Extracellular DNA in sera pregnant women. *Cell Biology International*. 18 (5): 527.
10. Mikhailov V., Stein G., **Kazakov V.**, Bozhkov V. Programmed Death of Decidual Cells. Cytochemical Events of Formation of Apoptosis. The Eighth International Conference of the International Society of Differentiation. Hiroshima 22–26 October 1994. 240.
11. Аксёнов Н. Л., **Казаков В. И.** Исследование полиморфизма Alu-повтора в гене X сцепленной умственной отсталости (FMR1) человека в нормальной популяции жителей Санкт-Петербурга. Материалы Всероссийской конференции «Актуальные вопросы неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики». Уфа 30 июня–03 июля 1998. 11–12.
12. Михайлов В. М., **Казаков В. И.**, Комаров С. А., Нилова В. К., Штейн Г. И., Баранов В. С. 2000. Деструкция и синтез ДНК в клетках миокарда мышей MDX. *Цитология*. 42(3): 297.
13. Назаров И. Б., **Казаков В. И.**, Хижа И. В., Рогозкин В. А., Томилин Н. В. Влияние полиморфизма гена ангиотензин-конвертирующего фермента на сердечно-сосудистую систему при систематических физических нагрузках. Тезисы докладов Второго съезда ВОГиС. Санкт-Петербург 1–5 февраля 2000. 2: 299-300.
14. **Казаков В. И.**, Назаров И. Б., Рогозкин В. А., Томилин Н. В. Влияние инсерционно-делеционного полиморфизма Alu-повтора в гене ангиотензин-конвертирующего фермента на спортивные достижения пловцов. Тезисы докладов второго (четвёртого) Всероссийского съезда медицинских генетиков. Курск 17–19 мая 2000. 1: 111-112.
15. Nazarov I., **Kazakov V.**, Tomilin N., Rogozkin V. Oxygen Consumption At Physical Loads Is Associated With ACE Genotype In Elite Athletes. 5th Annual Congress of the European College of Sport Science Finland, Jyväskylä 19-23 July 2000. 527.
16. Анацкий С. Ю., **Казаков В. И.** Новый метод выделения и анализа ДНК рыб из музейных коллекций. Материалы симпозиума «Экологические и функциональные основы адаптации гидробионтов», посвященного 100-летию со дня рождения профессора Н. Л. Гербельского. Санкт-Петербург 2000. 71–72.
17. Назаров И. Б., **Казаков В. И.**, Шнейдер О. В. Ассоциация полиморфизма ангиотензинпревращающего фермента с высшими достижениями в спорте. Материалы итоговой научной конференции Санкт-Петербургского научно-исследовательского института физической культуры. Санкт-Петербург 2000. 10–11.
18. Mikhailov V., Zelenin A., Krutilina R., **Kazakov V.**, Kolesnikov V., Kropotov A., Zelenina I., Baranov A., Ostapenko O., Baranov V., Tomilin N. 2002. Bcl-xL gene expression promoters survival and differentiation of mdx mice striated muscle fibers after gene gun delivery. *The Journal of the International Society of Differentiation*. 70 (7): 352.
19. Tomilin N., **Kazakov V.**, Oei S.-L. Modulation of gene expression by Alu retroposons. Abstracts 2nd International Workshop Retrotransposons and genome evolution. Sochi 20–22 April 2003. 14.
20. **Казаков В. И.**, Кадурина Т. И. Новые подходы к терапии с учётом инсерционно-делеционного полиморфизма гена ангиотензинпревращающего фермента. Тезисы VI Всероссийской научно-практической конференции "Актуальные вопросы клиники и лечения в многопрофильном лечебном учреждении", посвященной 300-летию Санкт-Петербурга и 205-летию Военно-Медицинской Академии. Санкт-Петербург 22–23 апреля 2003. 209.
21. Усманова Н. М., Казаков В. И., Томилин Н. В. Особенности строения промотора гена SAML человека и роль Alu-повтора в регуляции экспрессии этого гена. Материалы международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация». Пущино 5–7 июня 2007. 1: 44–45.

22. Усманова Н. М., **Казаков В. И.**, Томилин Н. В. 2007. О роли ретротранспозонов Alu-семейства в негативной регуляции транскрипции в клетках человека. Тезисы докладов и сообщений, представленных на II съезд Общества клеточной биологии совместно с юбилейной конференцией, посвященной 50-летию Института цитологии РАН. Санкт-Петербург 16–19, Октября. Цитология. 49(6): 800
23. Усманова Н. М., **Казаков В. И.** Роль Alu-повторов в регуляции экспрессии гена дезоксирибонуклеазы II человека. Сборник материалов международной молодежной научно-методической конференции «Проблемы молекулярной и клеточной биологии». Томск 9–12 мая 2008. 1: 172–173.

Главы в сборниках

1. Томилин Н. В., **Казаков В. И.** 1999. Роль ретропозонов Alu-семейства в возникновении наследственных заболеваний. В сборнике Медико-генетическая служба Санкт-Петербурга. 54–66.

Патент

1. Рогозкин В. А., Назаров И.Б., **Казаков В.И.** 2002. Патент на изобретение № 2194982 Способ выявления предрасположенности к длительной физической работе.

Учебно-методические пособия

1. **Казаков В. И.**, Ключева С. К. Принципы медико-генетического консультирования. Методическое пособие СПб: ГКДМГЦ 1999. 49 с.
2. **Казаков В. И.**, Ключева С. К., Прозорова М. В. Основы медико-генетического консультирования. Методическое пособие СПб: Издательский дом СПбМАПО 2002. 70 с.
3. **Казаков В. И.**, Усманова Н. М. Клеточная и геновая инженерия микроорганизмов. СПб: 2010. Издательство Санкт-Петербургского Политехнического университета. Учебное пособие с грифом УМО. 127 с.
4. **Казаков В. И.**, Усманова Н. М. Геновая и клеточная инженерия. СПб: 2011. Издательство Санкт-Петербургского Политехнического университета. Учебное пособие с грифом УМО. 278 с.

Под руководством Василия Ивановича Казакова защищена 1 кандидатская, 4 магистерские диссертации и 8 выпускных работ бакалавра.

Список цитируемой литературы

- Розанов Ю.М., Мамаева С.Е., Литвинчук Л.Ф., Савельева Л.Г., Гольцова Т.А. 1984. Цитология. 26 (9): 1079–1080. – Alvarez R., Terrados N., Ortolano R., Iglesias-Cubero G., Reguero J.R., Batalla A., Cortina A., Fernández-García B., Rodríguez C., Braga S., Alvarez V., Coto E. 2000. Eur J Appl Physiol. 82 (1–2): 117–120. – Bailey J. A., Carrel L., Chakravarti A., Eichler E. E. 2000. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 6634–6639. – Batzer M. A., Deininger P. L. 2002. Nat. Rev. Genet. 3: 370–379. – Bianchi D. W., Flint A. F., Pizzimenti M. F., Knoll J. H., Latt S.A. 1990. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 87: 3279–3282. – Bird A. 2002. Genes Dev. 16: 6–21. – Britten R. J. 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 5992–5996. – Carrel L., Willard H. F. 2005. Nature. 434: 400–404. – Carrel L., Park C., Tyekucheva S., Dunn J., Chiaromonte F., Makova K. D. 2006. PLoS Genet. 2: e151. – Chureau C., Prissette M., Bourdet A., Barbe V., Cattolico L., Jones L., Eggen A., Avner P., Duret L. 2002. Genome Res. 12: 894–908. – Csankovszki G., Nagy A., Jaenisch R. 2001. J. Cell. Biol. 153: 773–784. – Deininger P. L., Batzer M. A. 1999. Mol. Genet. Metab. 67: 183–193. – Gardiner-Garden M., Frommer M. 1987. J. Mol. Biol. 196: 261–282. – Gayagay G., Yu B., Hambly B., Boston T., Hahn A., Celermajer D.S., Trent R.J. 1998. Hum. Genet. 103 (1): 48–50. – Greally J. M. 2002. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99: 327–332. – Grover D., Majumder P. P., B Rao C., Brahmachari S. K., Mukerji M. 2003. Mol. Biol. Evol. 20: 1420–1424. – Grover D., Mukerji M., Bhatnagar P., Kannan K., Brahmachari S. K. 2004. Bioinformatics. 20: 813–817. – Hamdi H.K., Nishio H., Tavis J., Zielinski R., Dugaiczuk A. 2000. J. Mol. Biol. 299: 931–939. – Hansen R. S., Stoger R., Wijmenga C., Stanek A. M., Canfield T. K., Luo P., Matarazzo M. R., D'Esposito M., Feil R., Gimelli G., Weemaes C. M., Laird C. D., Gartler

S. M. 2000. *Hum. Mol. Genet.* 9: 2575–2587. – Hilgard P., Huang T., Wolkoff A.W., Stockert R.J. 2002. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283: 472–483. – Jelakovic B., Kuzmanic D., Milicic D. 2000. *Am. J. Hypertens.* 13: 182A. – Jurka J., Kohany O., Pavlicek A., Kapitonov V. V., Jurka M. V. 2003. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 1268–1272. – Kimura H., Sugaya K., Cook P. R. 2002. *J. Cell. Biol.* 159: 777–782. – Laperriere D., Wang T. T., White J. H., Mader S. 2007. *BMC Genomics.* 8: 23. – Lo Y. M. D., Corbetta N., Chamberlain P. F., Rai V., Sgaernt I. L., Redman C. W.G, Wainscoat J. S. 1997. *Lancet.* 350: 485–487. – Lyon M.F. 1998. *Cytogenet. Cell. Genet.* 80: 133–137. – Montgomery H. E., Marshall R., Hemingway H., Myerson S., Clarkson P., Dollery C., Hayward M., Holliman D. E., Jubb M., World M., Thomas E. L., Brynes A. E., Saeed N., Barnard M., Bell J. D., Prasad K., Rayson M., Talmud P. J., Humphries S. E. 1998. *Nature.* 393 (6682): 221–222. – Moss T. J., Wallrath L. L. 2007. *Mutat. Res.* 618: 163–174. – Myerson S., Hemingway H., Budget R., Martin J., Humphries S., Montgomery H. 1999. *J. Appl. Physiol.* 87: 1313–1316. – Nelson D., Ladbetter S., Corfo L. 1989. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 86: 6669–6686. – Ng K., Pullirsch D., Leeb M., Wutz A. 2007. *EMBO Rep.* 8: 34–39. – Olson D., Ledbetter S., Corfo L. 1989. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 6686–6689. – Perez-Stable C., Ayres T. M., Shen C.-K. J. 1984. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 5291–5295. – Polak P., Domany E. 2006. *BMC Genomics.* 7: 133. – Richard F., Berr C., Amant C., Helbecque N., Amouyel P., Alperovitch A. 2000. *Neurobiology.* 21: 75–80. – Rigat B., Hubert C., Alhenc-Gelas F., Cambien F., Corvol P., Soubrier F. 1990. *J. Clin. Invest.* 86: 1343–1346. – Roberts R. J., Myers P. A., Morrison A., Murray K. 1976. *J. Mol. Biol.* 102: 157–165. – Santosh S. A., Zhenyan Y., Weber J. L., Deninger P. L., Batzer M. A. 1995. *Genomics.* 29: 136–144. – Satijn D. P., Hamer K. M., den Blaauwen J., Otte A. P. 2001. *Mol. Cell. Biol.* 21: 1360–1369. – Sayed-Tabatabaei F. A., Oostra B. A., Isaacs A., van Duijn C. M., Witteman J. C. 2006. *Circ. Res.* 98: 1123–1133. – Scholz T., Garcia, H. H., Kuchta R., Wicht B. 2009. *Clinical Microbiology Reviews.* 22: 146–160. – Simpson J. L., Elias S. 1993. *JAMA.* 270: 19. – Smith K. P., Byron M., Clemson C. M., Lawrence J. B. 2004. *Chromosoma.* 113: 324–335. – Sorek R., Ast G., Graur D. 2002. *Genome Res.* 12: 1060–1067. – Taylor R. R., Mamotte C. D. S., Fallon K, Bockxmeer F. M. 1999. *J. Appl. Physiol.* 87: 1035–1037. – Tiret L., Rigat B., Visvikis S., Breda C., Corvol P., Cambien F., Soubrier F. 1992. *Am. J. Hum.Genet.* 51: 197–205. – Tsuchiya K. D., Greally J. M., Yi Y., Noel K. P., Truong J. P., Disteché C. M. 2004. *Genome Res.* 14: 1275–1284. – Waterston R. H., Lindblad-Toh K., Birney E. et al. (Mouse Genome Sequencing Consortium). 2002. *Nature.* 420: 520–562. – Wilkinson F. H., Park K., Atchison M. L. 2006. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 19296–19301. – Woods D. R., Humphries S. E., Montgomery H. E. 2000. *Trends Endocrinol. Metab.* 11: 416–420. – Yi P., Zhang W., Zhai Z., Miao L., Wang Y., Wu M. 2003. *FEBS Lett.* 534: 61–68. – Xing J., Hedges D. J., Han K., Wang H., Cordaux R., Batzer M. A. 2004. *J. Mol. Biol.* 344: 675–682.