

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. М. В. ЛОМОНОСОВА**

Биологический факультет
Учебно-научный центр кафедры генетики
биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова
и Института общей генетики
им. Н. И. Вавилова Российской академии наук

С. К. Абилев, В. М. Глазер

МУТАГЕНЕЗ

С ОСНОВАМИ ГЕНОТОКСИКОЛОГИИ

УДК 575
ББК 28.04
А15

Рецензенты:

доктор биологических наук, профессор *В. В. Зинченко*,
доктор биологических наук *А. В. Рубанович*

*Рекомендовано к опубликованию решением ученого
и учебно-методического советов биологического факультета
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

А15 Абилев С. К., Глазер В. М.

Мутагенез с основами генотоксикологии: учебное пособие. — М. ;
СПб. : Нестор-История, 2015. — 304 с.
ISBN 978-5-4469-0591-1

Учебное пособие состоит из двух частей: мутагенез и генетическая токсикология. Первая часть посвящена мутационной изменчивости, механизмам мутагенного действия радиации и химических агентов, инсерционному мутагенезу, репарации первичных повреждений ДНК и становлению мутаций, адаптивному мутагенезу. Вторая часть — основам генетической токсикологии: тест-системы, стратегия и правила тестирования химических соединений на генотоксичность, генетические основы индивидуальной чувствительности человека к генотоксичным факторам среды и антимуутагенез. Заключительная глава посвящена мутагенезу и канцерогенезу.

Для студентов, магистров и аспирантов, обучающихся по биологическим специальностям, а также для преподавателей учреждений высшего профессионального образования.

**УДК 575
ББК 28.04**

ISBN 978-5-4469-0591-1



© С. К. Абилев, В. М. Глазер, 2015

© Издательство «Нестор-История», 2015

Корректор *Н. В. Соболева*
Оригинал-макет *С. В. Буракова*
Дизайн обложки *А. А. Крыласов*

Подписано в печать 23.04.2015. Формат 60 × 84^{1/16}

Бумага офсетная. Печать офсетная

Усл.-печ. л. 19,00

Тираж 200 экз. Заказ № 4247

Отпечатано в типографии издательства «Нестор-История»

197110 СПб., ул. Петрозаводская, д. 7

Тел. (812)622-01-23

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	8
ЧАСТЬ I. МУТАГЕНЕЗ	11
Глава 1. НАСЛЕДСТВЕННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ	11
1.1. Виды наследственной изменчивости	11
1.2. Доказательства спонтанной природы мутаций	14
1.3. Спонтанные мутации у человека	18
1.4. Индуцированные мутации	22
1.5. Множественные аллели и генетический полиморфизм	23
1.6. Классификации мутаций	24
Глава 2. ГЕННЫЕ МУТАЦИИ	29
2.1. Точковые мутации	29
2.2. Структурные генные мутации	33
2.3. Причины возникновения генных мутаций	39
2.4. Методы выявления и количественного учета генных мутаций	43
2.5. Номенклатура генных мутаций	46
Глава 3. ХРОМОСОМНЫЕ МУТАЦИИ (АБЕРРАЦИИ)	49
3.1. Основные типы хромосомных aberrаций	49
3.2. Механизмы образования хромосомных aberrаций	54
3.2.1. Неаллельная гомологичная рекомбинация (эктопическая рекомбинация, ЭР)	55
3.2.2. Соединение негомологичных концов ДНК (<i>non-homologous end joining</i> – NHEJ)	59
3.3. Хромосомные aberrации у человека	60
3.4. Хромосомные разрывы при микроделеционных синдромах у человека	61
3.4.1. Общие принципы диагностики микроделеционных синдромов	63
3.5. Методы выявления хромосомных aberrаций	64
3.6. Номенклатура хромосомных aberrаций в клетках человека	65

Глава 4. ИНСЕРЦИОННЫЙ МУТАГЕНЕЗ.	68
4.1. Структура и классификация мобильных элементов	68
4.2. Генетические эффекты мобильных элементов	75
4.3. Инсерционный мутагенез, индуцированный вирусами	78
4.4. Горизонтальный перенос генов.	81
Глава 5. ГЕНОМНЫЕ МУТАЦИИ	85
5.1. Полиплоидия.	85
5.2. Анеуплоидия	87
Глава 6. РАДИАЦИОННЫЙ МУТАГЕНЕЗ.	92
6.1. Ионизирующие излучения.	93
6.2. Дозы облучения	95
6.3. Особенности действия радиации на живые объекты.	97
6.4. Воздействие радиации на человека	101
6.5. Оценка генетических последствий облучения	102
6.6. Цитогенетический метод биодозиметрии	107
6.7. Немишенные эффекты радиации.	110
6.7.1. Радиационно-индуцированная нестабильность генома	110
6.7.2. Эффект свидетеля (<i>bystander</i>) облучения	112
Глава 7. УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЕ ОБЛУЧЕНИЕ	115
Глава 8. ХИМИЧЕСКИЙ МУТАГЕНЕЗ	121
8.1. Механизмы действия химических мутагенов	122
8.2. Особенности действия химических мутагенов	133
Глава 9. РЕПАРАЦИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК И ФИКСАЦИЯ МУТАЦИЙ.	135
9.1. Типы повреждений ДНК	135
9.2. Системы репарации ДНК	136
9.2.1. Прямая репарация	136
9.2.2. Эксцизионная репарация	137
9.2.3. Репарация ошибок репликации (<i>mismatch repair – MMR</i>).	140
9.2.4. Рекомбинационная (пострепликативная) репарация двунитевых повреждений ДНК	142
9.2.5. Индуцибельная SOS-репарация у бактерий.	149

9.3. Репарация двунитевых разрывов ДНК и возникновение хромосомных перестроек	151
9.4. Становление мутаций.	153
Глава 10. АДАПТИВНЫЙ МУТАГЕНЕЗ	157
10.1. Адаптивный мутагенез у микроорганизмов.	157
10.2. Соматический гипермутагенез в дифференцирующихся В-лимфоцитах.	161
ЧАСТЬ II. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ.	169
Глава 11. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ: ПРОБЛЕМЫ И ЗАДАЧИ	169
11.1. Генетическая токсикология как новое научное направление.	169
11.2. Генотоксичные факторы окружающей среды	171
11.3. Проблемы и задачи генетической токсикологии	179
Глава 12. МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТОКСИКОЛОГИИ (ТЕСТ-СИСТЕМЫ)	183
12.1. Понятие о тест-системах	183
12.2. Методы учета индукции генных мутаций.	184
12.2.1. Тест Эймса <i>Salmonella</i> /микросомы	184
12.2.1.1. Характеристика тест-штаммов <i>Salmonella typhimurium</i>	184
12.2.1.2. Методические особенности теста Эймса	186
12.2.2. Методы учета генных мутаций в клеточных культурах <i>in vitro</i>	190
12.2.3. Трансгенные мышинные модели.	193
12.3. Цитогенетические тест-системы	193
12.3.1. Цитогенетические тесты <i>in vitro</i>	193
12.3.2. Цитогенетические тесты <i>in vivo</i>	194
12.4. Методы учета мутаций в половых клетках.	198
12.4.1. Тест по учету доминантных леталей у грызунов.	198
12.4.2. Тест по учету наследуемых транслокаций.	198
12.4.3. Метод специфических локусов на мышах.	199
12.5. Методы учета повреждений ДНК	200

12.5.1. SOS-хромотест (тест на индукцию SOS-ответа в клетках <i>E. coli</i>)	200
12.5.2. Методы определения повреждений ДНК в клетках млекопитающих	201
12.5.2.1. Метод щелочной элюции ДНК	202
12.5.2.2. Метод ДНК-комет	204
12.6. Правила тестирования	205
Глава 13. СТРАТЕГИЯ ТЕСТИРОВАНИЯ	208
13.1. Основные принципы стратегии тестирования	208
13.2. Стратегия оценки мутагенной активности для половых клеток	213
13.3. Оценка риска для последующих поколений	218
13.4. Внеэкспериментальный анализ	219
Глава 14. ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТЕСТ-СИСТЕМ	221
14.1. Зависимость генотоксического эффекта от тест-системы	221
14.2. Критерии прогностической эффективности тест-систем	223
14.3. Формализованный подход к оценке эффективности тест-систем	225
14.4. Проблемы экстраполяции экспериментальных данных на человека	228
Глава 15. БИОТРАНСФОРМАЦИЯ КСЕНОБИОТИКОВ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ	233
15.1. Биотрансформация ксенобиотиков	233
15.2. Образование мутагенных соединений в процессе биотрансформации ксенобиотиков	238
15.3. Генетически определенные различия в метаболизме ксенобиотиков у человека	245
Глава 16. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ	250
16.1. Методы натуральных исследований	250
16.2. Генетический мониторинг атмосферного воздуха	254
16.3. Генетический мониторинг водных источников	258
16.4. Генетический мониторинг почвы	261
16.5. Генетический мониторинг популяций человека	263

Глава 17. АНТИМУТАГЕННАЯ ЗАЩИТА ГЕНОМА	268
17.1. Классификация и механизмы действия антимутагенов.....	268
17.2. Антиоксиданты.....	274
17.2.1. Антиоксидантная система клетки.....	275
17.2.2. Антиоксиданты природного происхождения.....	277
17.2.3. Синтетические антиоксиданты.....	279
17.3. Механизмы антиоксидантной активности фенольных соединений.....	280
17.4. Фармакологические средств защиты генома.....	281
17.5. Антимутагенная активность пробиотиков.....	282
17.6. Критерии отбора антимутагенов и способы определения их активности.....	282
Глава 18. МУТАГЕНЕЗ И КАНЦЕРОГЕНЕЗ	284
18.1. Генетическая природа рака.....	284
18.2. Протоонкогены и антионкогены (онкосупрессоры).....	286
18.3. Многостадийная природа канцерогенеза.....	287
18.4. Мутаторный фенотип.....	294
18.5. Канцерогены.....	296
18.6. Уровни канцерогенной опасности.....	298
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	300
ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	304

ЧАСТЬ I

МУТАГЕНЕЗ

Глава 1

НАСЛЕДСТВЕННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ

1.1. Виды наследственной изменчивости

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Таблица 1.1

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

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

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

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

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

1.2. Доказательства спонтанной природы мутаций

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

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

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

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

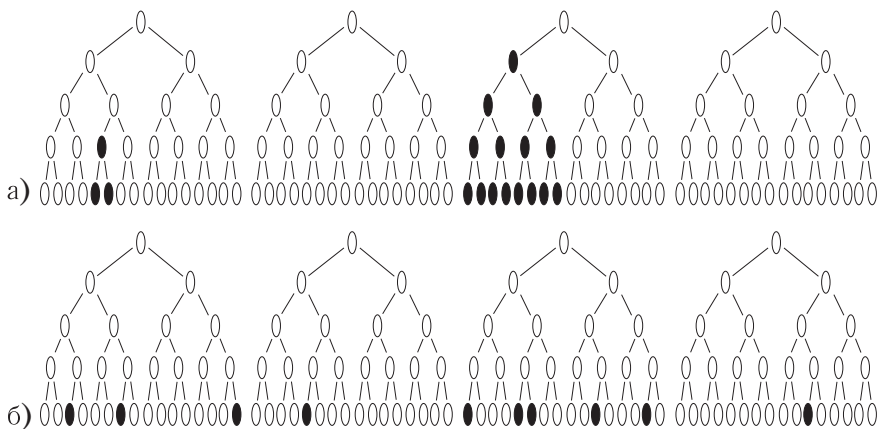


Рис. 1.1. Распределение мутантных устойчивых к фагам колоний бактерий по чашкам:

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

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

Таблица 1.2

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

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

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

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

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

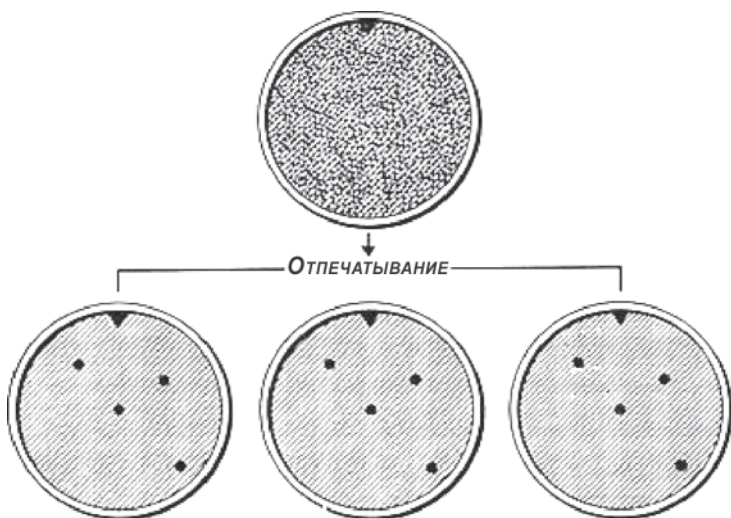


Рис. 1.2. Метод реплик

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

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

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

1.3. Спонтанные мутации у человека

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

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

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

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

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

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

В проекте при анализе полученных результатов анализировались следующие типы мутаций:

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

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

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

В геноме человека повторяющиеся последовательности делятся на:

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

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

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

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

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

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

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

Таблица 1.3

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

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

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

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

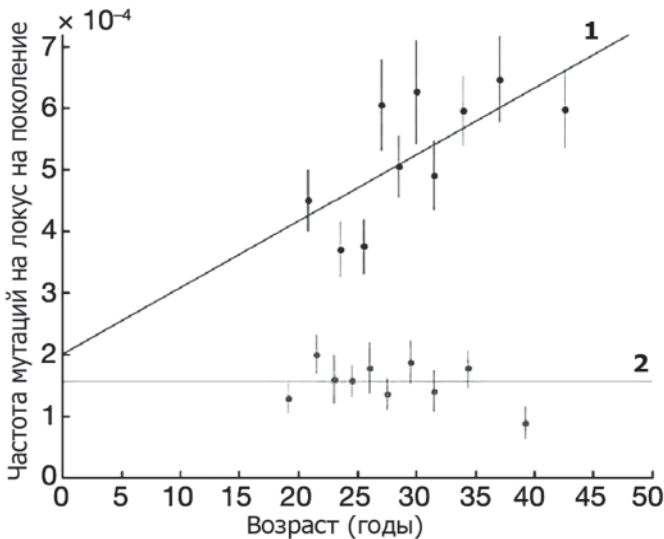


Рис.1.3. Зависимость частоты *de novo* индел-мутаций у ребенка в зависимости от возраста родителей:
1 — мутации, полученные от отца, 2 — мутации, полученные от матери
(Sun et al., 2012)

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

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

1.4. Индуцированные мутации

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

Различают несколько классов мутагенов:

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

Механизмы мутагенного действия указанных факторов обсуждаются в последующих главах.

1.5. Множественные аллели и генетический полиморфизм

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

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

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