

Природа та походження успадкованих мутацій у тандемно повторюваних ділянках геному людини

С. А. Кравченко, Л. А. Лівшиць

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна
livshits@imbg.org.ua

Проаналізовано літературні та власні дані дослідження природи та походження успадкованих мутацій у гіперваріабельних мінісателітних та мікросателітних локусах геному людини. Розглянуто можливі механізми, залучені до мутаційного процесу в локусах різної природи.

Ключові слова: мінісателітні та мікросателітні локуси, успадковані мутації, мутаційний рівень.

Мутаційна мінливість є важливим джерелом різноманіття успадкованих ознак, а темпи мутування – однією з найважливіших характеристик мутагенезу взагалі. Дані про мутаційний рівень у різних ділянках геному є дуже суттєвими як для розуміння самого механізму мутаційного процесу, так і для прогнозування генетичного навантаження за рахунок дії мутацій. Також відомості щодо мутабільності окремих ділянок геному є вкрай необхідними для пошуку інформативних маркерів, які можуть бути придатними для вирішення різних задач та популяційних досліджень.

У попередніх дослідженнях показано, що для різних ділянок геному людини рівень успадкованих мутацій широко варіює в межах від 10^{-9} для унікальних послідовностей до 10^{-2} для мікроса-

телітних послідовностей і навіть до 10^{-1} для деяких мінісателітних послідовностей [1–3].

Існує декілька підходів до вивчення рівня успадкованих мутацій:

– сімейний – пряме дослідження успадкування алелів від батьків до нащадків [4–6];

– пряме дослідження мутацій безпосередньо у статевих клітинах, зокрема в сперматозоїдах [7];

– філогенетичний – зіставлення філогенетичного дерева алелів поліморфних локусів близьких видів (такий підхід дозволяє оцінити історично накоплені мутації; одним із варіантів є вивчення нерівноважно зчеплених локусів, наприклад, з геном якого-небудь захворювання, при цьому можливо прослідкувати мутаційні події у значній кількості поколінь) [8, 9];

– оцінка швидкості мутацій *in vitro* в біологічних системах (може бути використаний для

вивчення як спонтанної частоти мутацій, так і мутагенного впливу різних факторів [10];

–метод математичного моделювання мутаційного процесу на основі реально існуючого розподілу частот алелів поліморфних локусів [11].

Дослідження мутаційного процесу в геномі людини отримало могутній імпульс у зв'язку з відкриттям у геномі людини поліморфізму тандемно повторюваних послідовностей ДНК, який віддзеркалює мутаційний процес у цих геномних локусах.

«Мінісателіти», або VNTR-локуси. Загальна характеристика мінісателітних локусів. На початку 80-х років минулого століття декілька груп дослідників відкрили та охарактеризували особливі гіперваріабельні ділянки геному людини. Їх було знайдено поряд з інсуліновими та альфа-подібними глобіновими генами, геном аполіпопротеїну В, у першому інтроні міоглобінового гена, а також у багатьох інших ділянках геному [12, 13]. Загальною властивістю зазначених гіперваріабельних ділянок було те, що в них знаходились послідовності, до складу яких входили короткі (максимум декілька десятків нуклеотидів), тандемно зосереджені повтори. В подальшому послідовності такого типу почали називати «мінісателітами». На відміну від класичної сателітної ДНК вони не асоційовані з центромерним гетерохроматином і зустрічаються, в основному, в теломерних та субтеломерних ділянках геному людини [14].

Під час аналізу декількох різних мінісателітів виявлено спільну серцевинну кор-ділянку розміром 10–15 п. н., яка, можливо, виконує функцію сигналу рекомбінації при утворенні поліморфних мінісателітних районів [15]. Розподіл мінісателітних локусів на хромосомі підтверджує це припущення – теломерні ділянки геному, де в основному зустрічаються мінісателіти, мають досить високий рекомбінаційний рівень [16]. Встановлено, що протилежні теломерні ділянки аутосом включають приблизно однакову кількість мінісателітних локусів, проте мінісателіти теломерних районів Х-хромосоми суттєво відрізняються один від одного [17]. Лише кілька мінісателітних локусів вдалося ідентифікувати на статево специфічній частині Х-хромосоми – області, де не відбуваються рекомбіна-



Рис 1. Аналіз «фінгерпринтів» ДНК різних індивідів (за Джефрізом [21]): 1–6 – індивіди з різним набором гібридаційних смуг різної довжини

ційні події під час мейозу у чоловіків. І навпаки, в псевдоаутосомній області спостерігається високий рекомбінаційний рівень, представлений великою кількістю мінісателітів [18]. При картуванні Y-хромосоми дослідники виявили лише один мінісателітний локус (D17155S1), який знаходився в псевдоаутосомній області цієї хромосоми [19].

Поліморфність мінісателітних локусів. До початку 90-х років ХХ століття ДНК-типсування гіперваріабельних ділянок базувалося на використанні гібридації за методом Саузерна. Вперше Джефріз із співавт. на основі мінісателіта інтронної послідовності міоглобіну сконструювали зонди 33,6 та 33,15, які «впізнавали» різні гіперваріабельні ділянки ДНК [20]. Дійсно, отримані таким шляхом картинки гібридації демонструють одночасне детектування великої кількості мінісателітних районів геному людини, багато з яких є поліморфними, тобто містять у різних індивідів різну кількість повторюваних елементів. Наочно такий мультилокусний поліморфізм виявлявся на радіоавтографах набором гібридаційних смуг різної довжини, які ще часто називають «фінгерпринтами» ДНК (рис. 1).

Рівень гетерозиготності таких мультилокусних ДНК-«фінгерпринтів» у досліджуваній популяції виявився дуже високим і сягав майже 100 %. Слід зазначити, що саме такий високий ступінь

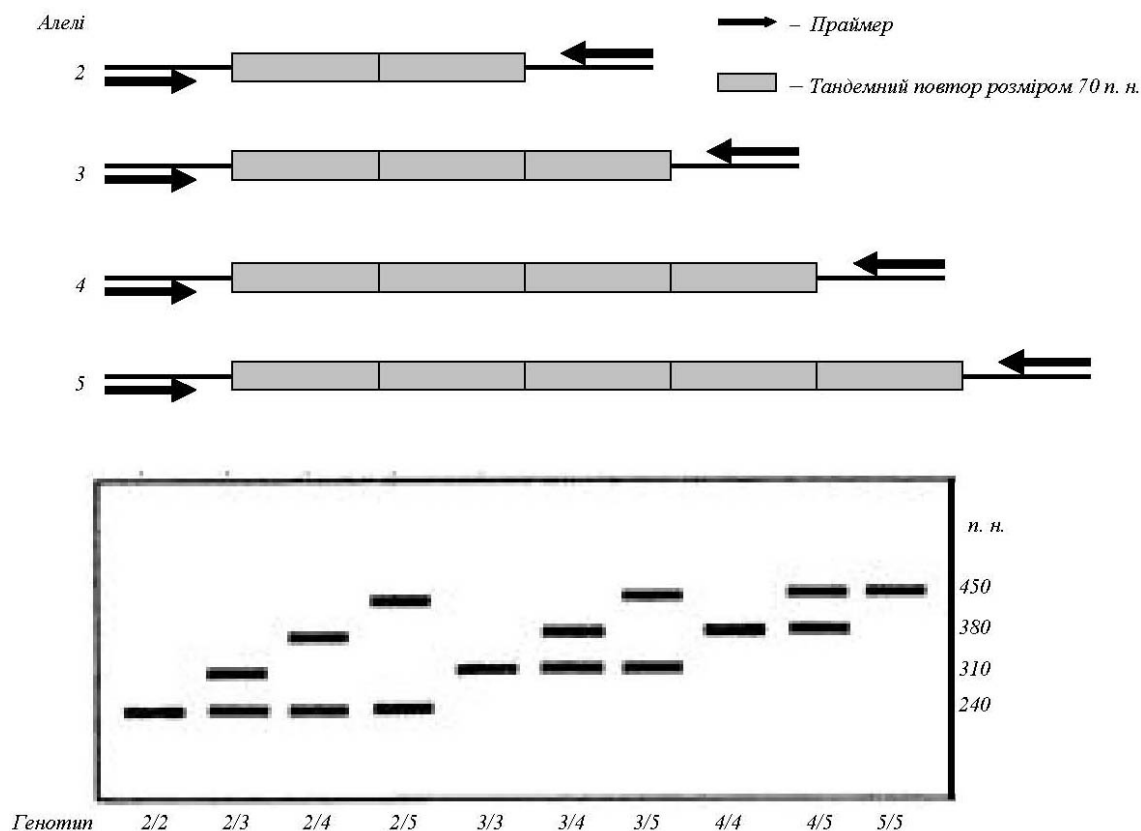


Рис. 2. Схематичне зображення різних алелів чотирьохалельного VNTR-локусу та типування різних генотипів під час електрофоретичного розділення продуктів ПЛР

поліморфізму мінісателітних локусів є однією з найважливіших характеристик цих гіперваріабельних районів геному людини [21]. Проте використання гібридизації за методом Саузерна для аналізу мультилокусного поліморфізму мінісателітних локусів мало свої досить суттєві недоліки – у разі, коли мінісателітні локуси входили до складу відносно великих фрагментів ДНК, було дуже важко, а в деяких випадках практично неможливо ідентифікувати алелі, які відрізнялися один від одного лише декількома парами нуклеотидів. До того ж алелі різних локусів можуть мати однаковий розмір гібридизаційних фрагментів, внаслідок чого вивчення однієї з основних характеристик поліморфного локусу – популяційної частоти конкретних алелів – стає неможливим.

Швидкий розвиток методу ампліфікації ДНК *in vitro* [22], що ґрунтується на полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР), корінним чином змінив ситуацію з аналізом гіперваріабельних локусів і дозво-

лив зняти обмеження, які знижували ефективність їхнього використання як маркерів різних ділянок геному. Застосовуючи відповідні олігонуклеотидні праймери, комплементарні досліджуваній ділянці хромосоми, і термостабільну ДНК-полімеразу можна ампліфікувати будь-який конкретний фрагмент геномної ДНК з мінісателітними локусами включно. Різні алелі мінісателітного локусу відрізняються за кількістю тандемних повторів, які входять до його складу. Тому у мінісателітних локусів після відкриття ПЛР з'явилася інша назва – VNTR-локуси, або локуси, у яких кількість тандемних повторів варіює (*variety number of tandem repeats*). Таким чином, різні алелі поліморфного локусу можуть мати різну довжину і, як наслідок, – різну міграційну рухливість під час електрофоретичного розділення продуктів ПЛР (рис. 2).

На сьогодні в геномі людини відкрито декілька сотень однолокусних VNTR-систем, більшість з яких є високополіморфними (рівень гетерозигот-

Таблиця 1
Хвороби експансії тринуклеотидних повторів

Захворювання	Локалізація	Повтор	Число копій гена	
			Норма	Патологія
Синдром ламкої Х-хромосоми (FRAXA)	Xq27.3	CGG	5–50	> 200
Синдром ламкої Х-хромосоми (FRAXE)	Xq27.3	GCC	6–25	> 200
Синдром ламкої Х-хромосоми (FRAXF)	Xq28	GCC	12–26	> 900
Спінобульбарна м'язова атрофія	Xq11-12	CAG	17–26	40–52
Міотонічна дистрофія	19q13.3	CTG	5–27	50–1600
Хорея Гентінгтона	4p16.3	CAG	11–34	> 42
Спинномозково-мозочкова атаксія	6p21.3	CAG	25–36	43–81
Хвороба Мачадо-Джозефа	14q32.1	CAG	13–36	68–79
Атаксія Фрідрайха	9p13	GAA	7–22	291–900

ності перевищує 80 %), що дозволяє ефективно їх використовувати як генетичні маркери в різних галузях біології та медицини.

Мікросателіти, або STR-локуси. Загальна характеристика. На початку 90-х років минулого століття з'явилися роботи різних груп дослідників, яким вдалося охарактеризувати новий тип повторюваних послідовностей у геномі людини – мікросателітні локуси [23, 24]. Як і мінісателіти, мікросателіти також складаються з тандемно організованих повторів, але повторюваний мотив їх варіює від 2 до 6 п. н. Ці локуси отримали іншу назву – короткі тандемні повтори, або STR-локуси (short tandem repeats) [25]. На відміну від VNTR-локусів, які розміщуються, в основному, у теломерних ділянках хромосоми, STR-локуси дисперговані по всьому геному людини і зустрічаються в середньому через кожні 6–10 тис. п. н. Поліморфні мікросателітні послідовності виявлено як у некодуючих міжгенних, так і в кодуючих ділянках геному людини [26]. Найрозповсюдженішими мікросателітами є динуклеотидні повтори, до складу яких найчастіше входять пари нуклеотидів AC на одному ланцюгу ДНК і відповідно GT – на іншому. Також описано й інші STR-локуси, які складаються з три-, тетра- та пентануклеотидних повторюваних мотивів. Розрізняють STR-локуси не лише за нуклеотидним складом тандемного повтору, а й за кількістю цих повторів: локуси з низьким ступенем варіації складаються з тан-

демних повторів, кількість яких не перевищує 15; до складу локусів із середнім ступенем варіації входять до 25 тандемних повторів і, нарешті, локуси з високим ступенем варіації можуть містити понад 25 тандемних повторів [27].

Незважаючи на те, що STR-локуси містяться не тільки в некодуючих, але і в кодуючих ділянках геному людини, до сьогодні не з'ясовано їхньої будь-якої загальнобіологічної ролі. В літературі зустрічаються окремі гіпотези щодо функцій окремих мікросателітів. Так, ідентифіковано білки, які специфічно зв'язуються з деякими ди- та тринуклеотидними повторами у складі ДНК [28], один з яких, принаймні, може бути залучений до процесу збирання нуклеосом *in vitro* [29]. Для тринуклеотидних повторів встановлено їхню очевидну роль при синдромі ламкої Х-хромосоми, міотонічній дистрофії, хорей Гентінгтона та інших нейродегенеративних захворюваннях (табл. 1). Це новий клас спадкових хвороб, в основі розвитку яких лежить єдиний механізм – динамічна мутація. Динамічна мутація – це збільшення (експансія) числа копій тринуклеотидних повторів у послідовних поколіннях певного родоводу.

Експансія повторів супроводжується проявом захворювання при підвищенні деякого порогового числа цих повторів. Встановлено, що різке зростання кількості повторів є причиною повного виключення транскрипції відповідних або поряд розміщених генів, що призводить до розвитку зазначених захворювань [30]. Показано також і обернену залежність числа тринуклеотидних повторів з транскрипційною залежністю генів, до складу яких входять такі повтори [31].

Імовірні молекулярні механізми мінісателітної та мікросателітної нестабільності. У цілій низці досліджень виявлено, що для мінісателітних та мікросателітних локусів характерним є дуже високий рівень успадкованих мутацій [3, 5, 32, 33]. Основними типами мутацій у цих локусах є делеції або інсерції тандемних повторів, які входять до складу міні- та мікросателітних локусів. Саме варіюванням кількості тандемно повторюваних одиниць пояснюється мінісателітний та мікросателітний поліморфізм. Точні механізми, які спричиняють цю нестабільність, залишаються невідомі.

мими, але більша частина даних, отриманих або в культурі клітин людини *in vitro*, або в модельних експериментах на *Escherichia coli*, вказують на те, що головну роль у мутаційному процесі в мінісателітних локусах відіграє генна конверсія [34]. Помилки при реплікації ДНК – «просковзування» реплікації (replication slippage) вважають джерелом мутацій для мікросателітних локусів [30].

Підвищена частота мутування мінісателітних локусів отримала назву мінісателітної нестабільності (МНН). При цьому швидкість мутування окремих мінісателітних локусів може значно відрізнятись, але для більшості локусів вона складає $2 \cdot 10^{-4}$ [32]. Основним механізмом утворення згаданих мутацій вважають процес генної конверсії під час рекомбінації [34].

Генна конверсія – це модифікація одного з двох алелей іншим. Кінцевий результат її дуже подібний до результату подвійного нерівного кросинговеру. Відмінністю між цими двома процесами є те, що модифікація одного алеля (мішені) після генної конверсії є нереципрокнутою, оскільки інший алель (джерело) залишається незмінним. На практиці у людини звичайно не можна розрізнити ці два процеси, тому що неможливо проаналізувати обидва продукти рекомбінації. До того ж зміна гаплотипів як під час генної конверсії, так і в результаті подвійного нерівного кросинговеру є ідентичною.

Конкретні докази на користь механізму утворення делецій (зменшення кількості повторюваних послідовностей) і, особливо, інсерцій (зростання числа повторюваних послідовностей) у чоловічих статевих клітинах отримано при дослідженнях послідовностей з високим рівнем мутацій в статевих клітинах. Детальним аналізом нуклеотидних послідовностей батьківського і мутованого алелів локусу MS13 Джефрізу та співавт. вдалося довести, що більшість мутантних варіантів (частина делецій і всіх інсерцій) утворилися саме в результаті процесу рекомбінації [35]. У той же час автори показали, що невелика частина мутацій, зокрема делецій, може утворюватися просто за рахунок втрати певної частини послідовності. Цей процес, скоріш за все, може бути результатом дволанцюгових розривів ДНК (DSB – double strand break), які відбуваються в мінісателітних локусах і призводять після їхньої ре-

парації до утворення алельних варіантів різної довжини [36]. Передбачається, що високий рівень мутацій в мінісателітних локусах саме тим і зумовлений, що вони є «гарячими точками» рекомбінації та дволанцюгових розривів ДНК.

Висока частота мутування мікросателітних локусів отримала назву мікросателітної нестабільності (МКН). Це явище було описане на початку 90-х років ХХ століття. В ДНК, отриманій з клітин пухлин пацієнтів зі спадковим неполіпозним колоректальним раком, з високою частотою (понад 50 %) спостерігали алельні варіанти, не характерні для нормальної ДНК індивіда [37]. Більша частина даних вказує на те, що головну роль у механізмі утворення МКН відіграють помилки при реплікації, а саме – її «просковзування». При цьому ДНК-полімераза тимчасово дисоціює в реплікативній вилці з утворенням неспареної ділянки ДНК. Повторювана тандемна одиниця потім реасоціює на деякій відстані, але вже не з гомологічним повтором. На місці неправильного спарювання утворюється шпилька із фрагмента ДНК, який повторюється, а ДНК-полімераза продовжує добудовувати ДНК від місця «просковзування». Формування цих шпильок може відбуватися в будь-якому з двох щойно синтезованих ланцюгів та призводить до делецій або інсерцій. Цей же механізм «просковзування» реплікації з подальшим утворенням енергетично стійких структур типу шпильок, очевидно, лежить в основі збільшення числа тринуклеотидних повторів при синдромі ламкої Х-хромосоми, міотонічній дистрофії, хорей Гентінгтона та в цілій низці інших захворювань, так званих хвороб з експансією тринуклеотидних повторів [30]. Окрім шпильок, причиною «просковзування» ДНК-полімерази можуть бути й інші конформаційні зміни структури ДНК. У літературі є дані, що при локальному метилюванні ДНК в мікросателітних послідовностях створюються особливі чотирьохнитчасті тугоплавкі структури, внаслідок чого порушується процес реплікації, що спричинює зміну числа повторів [38].

Більшість отриманих на сьогодні даних вказує саме на те, що помилки при реплікації відіграють головну роль у мутаційному процесі мікросателітних локусів. В клітинних лініях з порушеною

системою репарації невідповідності нуклеотидів (місматч-репарації) спостерігався різкий ріст мутацій – МКН [39]. З іншого боку, «просковзування» ДНК – це внутрішньоспіральна подія, тому частота мутацій не повинна залежати від частоти хіазм. Встановлено, що мутації, які елімінують рекомбінацію, не впливають на швидкість мутацій ні в *E. coli*, ні в *Saccharomyces cerevisiae* [40, 41]. Не було також виявлено зв'язку з підвищеною частотою мутацій в тих мікросателітних локусах генома, для яких характерна висока частота рекомбінації, та у людини [4]. І нарешті, основним доказом реплікативної природи походження мутацій є те, що мікросателітні локуси, локалізовані в нерекомбінуючій ділянці Y-хромосоми людини, мають швидкість мутування, аналогічну аутосомним локусам, що неможливо для процесу, пов'язаного з рекомбінацією [5, 33, 42].

Попередні дослідження засвідчили неоднакову швидкість мутування окремих мікросателітних локусів. Для більшості з них серед проаналізованих на сьогодні локусів мутаційна частота в середньому складає $2 \cdot 10^{-3}$ [5]. Які фактори впливають на мутаційну здатність мікросателітних локусів? Причини неоднакової швидкості мутування, напевно, полягають у розташуванні конкретного локусу на хромосомі, його структури та складу. Так, у полі(GT)-тракті двох штамів дріжджів *S. cerevisiae* (дикого типу і з дефіцитом системи місматч-репарації) при дослідженні частоти мутацій алелів розміром 15, 33, 51, 99 і 105 п. н. виявлено нелінійне зростання нестабільності із збільшенням довжини алеля. Незважаючи на те, що алель розміром 105 п. н. довший за алель розміром 15 п. н. всього в 7 разів, швидкість його мутування була вищою в 500 разів. Оскільки подібне співвідношення спостерігалось в обох штаммах, це дозволило виключити як причину ефекту меншу ефективність системи репарації ДНК в одному із штамів [41]. Подібні закономірності спостерігали, досліджуючи і мікросателіти людини [4, 42]. У роботі Брінкмана зі співавт. [5] показано, що частота мутацій в локусі переважно залежить від його складу – нестабільність експоненційно підвищується із збільшенням довжини монотонно повторюваного тракту. Вставки іншого нуклеотидного складу стабілізують ділянку ДНК. Подібний

феномен спостерігався при вивченні захворювань з експансією числа тринуклеотидних повторів, а також і для динуклеотидних STR [40]. Таким чином, різна мутаційна здатність локусів і навіть різних алелів у складі одного локусу значною мірою пояснюється варіаціями їхньої довжини та нуклеотидного складу.

Аналіз батьківського походження мутацій в мінісателітних і мікросателітних локусах, здійснений у цілій низці досліджень показав, що мутації переважно виникали в ході гаметогенезу у чоловіків. Очевидно, переважання батьківських мутацій – це загальна тенденція, характерна як для мінісателітних, так і для мікросателітних послідовностей ДНК. За даними Брінкмана зі співавт. [5], співвідношення батьківських і материнських мутацій в мікросателітних локусах складало 17:3, а в дослідженнях Сайантила зі співавт. [6] 10 мутацій з 11 виникли в гаметогенезі батька. Подібну тенденцію встановлено і для мінісателітних локусів – у наших дослідженнях [43] та в дослідженнях Дуброви зі співавт. [44] причиною переважання мутацій батьківського походження, скоріш за все, є те, що протягом дозрівання сперматозоїди зазнають на порядок більше циклів реплікації, аніж яйцеклітини. У жінок незалежно від віку до початку мейозу в оогоніях відбувається 22 мітотичних поділи, тоді як у чоловіків кількість поділів, які пройшли у сперматогоніях, суттєво залежить від віку. Наприклад, у чоловіків у віці 28 років спермії проходять приблизно через 380 мітозів, а у віці 35 років – через 540 мітозів (тобто в 16 і 25 разів більше, ніж ооцити відповідно) [45]. Якщо різниця у кількості мутаційних подій в гаметогенезі дійсно є наслідком різного числа циклів реплікації ДНК, то повинна спостерігатися залежність частоти «батьківських» мутацій від віку батька. Таку закономірність справді було виявлено: середній вік батьків з мутаціями в мікросателітних локусах був вірогідно вищим за середній вік батьків, без мутацій [33, 46]. Однак відсутність прямої залежності між співвідношенням числа мітозів у гаметогенезі різних статей і мутаційним рівнем може вказувати на існування впливу на нього якихось інших факторів. ДНК чоловічої статеві лінії може відрізнятися від жіночої за статусом метилювання, температурними режи-

мами, чутливістю до дії вільних кисневих радикалів та інших потенційно мутагенних сполук, які продукуються яєчками [47].

Також передбачають, що більш ніж у 90 % випадків мутації в мінісателітних та мікросателітних локусах мають так званий «однокроковий» характер, і нові алелі поліморфного локусу утворюються за «однокроковою» моделлю (SSM – single step mutation) [48]. Суть моделі зводиться до того, що при зміні стану алеля через вплив якоїсь мутації (делеції або інсерції) він буде заміщений на один крок або в позитивному, або в негативному напрямку алельного простору. Вважається, що «двокрокові», а тим більше «багатокрокові» мутації зустрічаються набагато рідше [5].

Таким чином, на відміну від унікальних геномних послідовностей з дуже низькою частотою мутування повторювані послідовності перебувають у стані постійних змін. Вивчення закономірностей індукції мутацій в міні- та мікросателітних локусах виявило низку важливих аспектів, пов'язаних з можливим застосуванням цих систем для генетичного моніторингу [49]. Водночас розвиток методу ПЛР дозволив точно і досить просто визначати алельні варіанти поліморфних мінісателітних та мікросателітних локусів. Так, зручність визначення алельних варіантів та високий ступінь поліморфізму міні- та мікросателітів зробили їх зручними засобами для вирішення різних дослідницьких завдань.

Використання мінісателітних і мікросателітних локусів як модельних систем для оцінки мутагенних та ендегенних факторів нестабільності геному. Останнім часом з'явилася значна кількість робіт, у яких пропонують використовувати міні- та мікросателіти як модельні системи для оцінки мутагенної дії факторів різної природи. Виходячи з виявленого високого рівня (до 15 %) спонтанних мутацій мінісателітів групи СЕВ [3] можна очікувати, що ці гіперваріабельні локуси є дуже цікавими не лише як об'єкт дослідження молекулярно-генетичних механізмів спонтанного мутагенезу, а й для з'ясування закономірностей індукovanого мутагенезу. Зокрема, можна передбачити, що їх можна використати як потенційні маркери для дослідження мутагенної дії іонізуючого вип-

роміювання на рівні ДНК. Цікавими і суперечливими виявилися результати досліджень авторів з Японії, Великої Британії та України, які вивчали мутагенну дію іонізуючого випромінювання на гіперваріабельні мінісателіти групи СЕВ.

Так, автори з Японії показали, що рівень успадкованих мутацій в мінісателітних локусах нащадків, які народилися через кілька років після того, як їхні батьки пережили атомне бомбардування у містах Хіросімі і Нагасакі в 1945 році, не відрізняється від такого в контрольній групі. Тому було зроблено висновок про відсутність мутагенної дії іонізуючої радіації на вивчені мінісателіти статевих клітин [50].

Зовсім протилежні дані отримано дослідниками з Великої Британії. Дуброва та співавт., здійснюючи моніторинг радіаційно індуктованих мутацій серед населення Могильовської області Білорусії, які проживали на забруднених радіонуклідами територіях в результаті аварії на ЧАЕС, виявили майже дворазове збільшення частоти мутацій в мінісателітних локусах порівняно з контрольною групою [44, 51]. Цією ж групою дослідників показано, що внаслідок радіоактивного забруднення під час випробування ядерної зброї в колишньому Радянському Союзі у районі Семіпалатинська частота індуктованих у мінісателітних локусах мутацій серед населення, яке протягом багатьох років проживало на цих територіях, була в два рази вищою у порівнянні з контрольною групою [52].

Можливо, розбіжності в результатах, отриманих згаданими групами дослідників, можуть бути пов'язані з декількома факторами. По-перше, вибухи ядерних бомб в Хіросімі і Нагасакі призвели до одномоментного гострого опромінення жителів, тоді як після аварії на ЧАЕС та випробування ядерної зброї в Семіпалатинську населення цих регіонів перебувало під впливом багаторічного хронічного опромінення. По-друге, більшість японських дітей народилися через 10 і більше років після вибухів і за цей час можливі індуквані пошкодження в структурі ДНК могли бути ліквідовані системами репарації.

Дослідження індуктованих мутацій в мінісателітних локусах у дітей батьків – ліквідаторів аварії на ЧАЕС проведено нами спільно із фран-

цюзькими дослідниками. Так, за результатом аналізу частоти мутацій у дітей, які були зачаті після запліднення материнських яйцеклітин сперміями, що формувалися під впливом іонізуючої радіації (під час роботи батьків – ліквідаторів на ЧАЕС), і у дітей, зачатих через чотири і більше місяців після закінчення терміну роботи їхніх батьків на ЧАЕС, виявилось, що рівень успадкованих мутацій в першій групі був 1,5 разу вищим, ніж у другій. Але знайдена нами різниця виявилася статистично невірогідною [43].

Поряд з мінісателітними локусами результати цілої низки досліджень мікросателітів також вказує на доцільність використання їх як інструмента для генетичного моніторингу мутагенних та ендегенних факторів нестабільності геному. Встановлено, що мікросателітна нестабільність з високою частотою (до 50 %) спостерігають у пухлинах пацієнтів з дрібноклітинним раком легенів, пухлинами голови та шиї (29 %) і раком молочної залози (28 %). Все це підтверджує суттєву роль нестабільності геному соматичних клітин у патогенезі злоякісних новоутворень [53, 54]. Групою грецьких дослідників виявлено підвищену частоту мутування мікросателітів, не пов'язаних з протоонкогенами, в клітинах спонтанно абатованих ембріонів [55]. При аналізі успадкування тандемних повторів у 21 різному STR-локусі в родинах із спонтанними абортами російськими дослідниками встановлено, що загибель значної кількості ембріонів людини з нормальним каріотипом асоційована з підвищеним рівнем мутацій мікросателітів гаметичного та соматичного походження, який практично в 5 разів перевищує спонтанний рівень мутування мікросателітів [49]. Пізніше цими ж авторами для аналізу мутаційної мінливості мікросателітів у мейозі і її можливого зв'язку з порушенням ембріонального розвитку проведено дослідження гаметичних мутацій *de novo* в родинах із здоровими дітьми та в родинах із спонтанними абортусами з нормальним каріотипом. У родинах із невиношуванням вагітності частота гаметичних мутацій була майже вдвічі більшою, ніж у родинах з нормальною репродуктивною функцією – $4,4 \cdot 10^{-3}$ та $2,3 \cdot 10^{-3}$ відповідно, але ця різниця виявилася статистично недовірною ($P = 0,25$) [56]. Тут необхідно зауважити,

що при вивченні досить рідкісних подій в порівнюваних вибірках для отримання статистично достовірної різниці між ними як головний критерій достовірності постає мінімальний обсяг вибірки. Так, дослідження показують, що лише десятки, а то й тисячі аналізованих алелів можуть дати більш-менш надійну інформацію стосовно нових алелів і мутаційного процесу, який обумовлює їхню появу [57]. Звичайно, це досить складне і трудомістке завдання, вирішення якого можливе лише спільними зусиллями багатьох лабораторій. Наведені факти можуть вказувати на те, що підвищена частота мутацій в мікросателітних локусах слугує індикатором значних функціональних змін у роботі генетичного апарату клітин. На користь цього переконливо свідчить той факт, що клітинні лінії, які проявляють мікросателітну нестабільність, демонструють також і зростання частоти мутування експресованих генів [58].

Аналіз успадкованих мутацій, які виникають у деяких міні- та мікросателітних локусах статевих клітин людини. Аналіз спонтанних мутацій типу делеції–інсерції, які виникають в мінісателітних локусах статевих клітин і виявляються як втрати частини послідовності мінісателітного локусу (делеція) або як збільшення кількості копій тандемно повторюваних одиниць (інсерція), проведено нами серед членів 163 родин (мати, батько, діти) в семи гіперваріабельних мінісателітних локусах: СЕВ1 (D2S90), СЕВ15 (D1S172), СЕВ72 (D17S888), СЕВ42 (D8S358), СЕВ36 (D10S473), СЕВ25 (D10S180) [59] і В6.7 (локалізований на хромосомі 20 в області q13) [60].

Для оцінки варіювання алелів у досліджуваній популяції нами здійснено аналіз спектра довжини гібридизаційних фрагментів, виявлених під час аналізу послідовностей усіх семи мінісателітних локусів у батьків і матерів (неспоріднених індивідів). Знайдена в результаті аналізу дуже велика кількість алельних варіантів свідчить про високий мутаційний рівень досліджуваних мінісателітних локусів. Цікаво зазначити, що в п'яти із семи проаналізованих локусів нами виявлено майже однаково кількість алелів (від 87 до 90). Трохи «біднішим» був спектр алелів для локусу СЕВ42 – виявлено 77 різних варіантів. Найменшу кількість різних

Таблиця 2
Рівень успадкованих мутацій материнського та батьківського походження в мінісателітних локусах дітей

Зонд	Батьківські			Материнські			Всього		
	Кількість алелів	Кількість мутацій	Мутаційний рівень	Кількість алелів	Кількість мутацій	Мутаційний рівень	Кількість алелів	Кількість мутацій	Мутаційний рівень
СЕВ 1	163	23	0,1411	163	0	–	326	23	0,071
СЕВ 15	153	5	0,0327	153	0	–	306	5	0,016
СЕВ 25	123	8	0,065	123	1	0,0081	246	9	0,037
СЕВ 36	160	0	–	160	4	0,0250	320	4	0,013
СЕВ 42	150	1	0,0067	150	1	0,0067	300	2	0,007
СЕВ 72	161	4	0,0248	161	4	0,0248	322	8	0,025
В6.7	126	10	0,0794	126	3	0,0238	252	13	0,052

варіантів нами відмічено при аналізі послідовності мінісателітного локусу СЕВ72 – всього 35 алелів. За результатами аналізу мутацій у семи мінісателітних локусах у дітей визначено 64 мутантних алельних варіанти, які відрізнялися від батьківських і материнських. Приклад такого аналізу для локусу СЕВ1 наведено на рис. 3. Для всіх дітей з виявленими мутаціями біологічне батьківство підтверджене ($P > 99,99\%$) методом генотипування членів родини.

У табл. 2 представлено результати аналізу кількості мутацій материнського та батьківського походження, зафіксованих у дітей. Отримані дані свідчать про те, що успадковані мутації зареєстровано для всіх семи аналізованих локусів. Наймутабільнішим виявився локус СЕВ1. Цікаві дані отримано щодо спектра мутацій, а саме – делецій та інсерцій. Підсумований за всіма проаналізованими локусами відсоток делецій чоловічого походження становив 39,61% і був статистично достовірно меншим за відсоток інсерцій, виявлених у 60,4% випадків. При аналізі спектра мутацій материнського походження з'ясувалося, що рівень делецій та інсерцій був приблизно однаковим і становив 54 та 46% відповідно (відмінності статистично недостовірні).

Нами вивчено розподіл алельних варіантів мінісателітів, які мутували в статевих клітинах батьків (чоловіків та жінок), а також успадкованих мутантних алелів їхніх дітей. Одержані дані свідчать про те, що найнестабільнішими є алельні варіанти, що містять послідовності від 2 до 5 тис. п. н. – з них утворювалося більш ніж 70% усіх успадкованих

дітьми мутацій. При цьому новоутворені мутантні алелі частіше мали розмір від 2 до 3 тис. п. н.

Аналіз розміру інсерцій та делецій свідчить про те, що довжина втраченої (делеція) або набутої (інсерція) послідовності складає в середньому 300 п. н.

Таким чином, можна припустити, що мутагенез і успадкування відбуваються як динамічний стабілізаційний процес, який підтримує розподіл алельних варіантів у популяції. Але при цьому важливо відзначити, що інсерції становили переважну більшість (78,2%) від загальної кількості мутацій у послідовності локусу СЕВ1, тобто того, який вирізняється (за результатами нашого дослідження та даними інших авторів) надзвичайно високим рівнем мутабільності (14,11%), причому винятково в чоловічих статевих клітинах [3, 51]. Отже, за даними проведених досліджень можна зробити припущення, що переважна більшість успадкованих мутацій утворилася в чоловічих статевих клітинах. Той факт, що в локусі СЕВ1 ми спостерігаємо надлишок саме інсерцій, тобто мутацій, які призводять до збільшення кількості тандемно повторюваних послідовностей, може свідчити на користь того, що основним механізмом мутагенезу в таких мінісателітних послідовностях, скоріш за все, є генна конверсія, яка має місце під час мейотичних рекомбінаційних подій протягом гаметогенезу.

Дослідження рівня гаметичних мутацій (делеції/інсерції) здійснено нами і для інших мінісателітних локусів – АРОВ (2p23-p24.2q), PYNZ22 (17p13), IGHJ (14q32.33), РМСТ118 (хромосома 1). За цими мінісателітними локусами проаналізовано

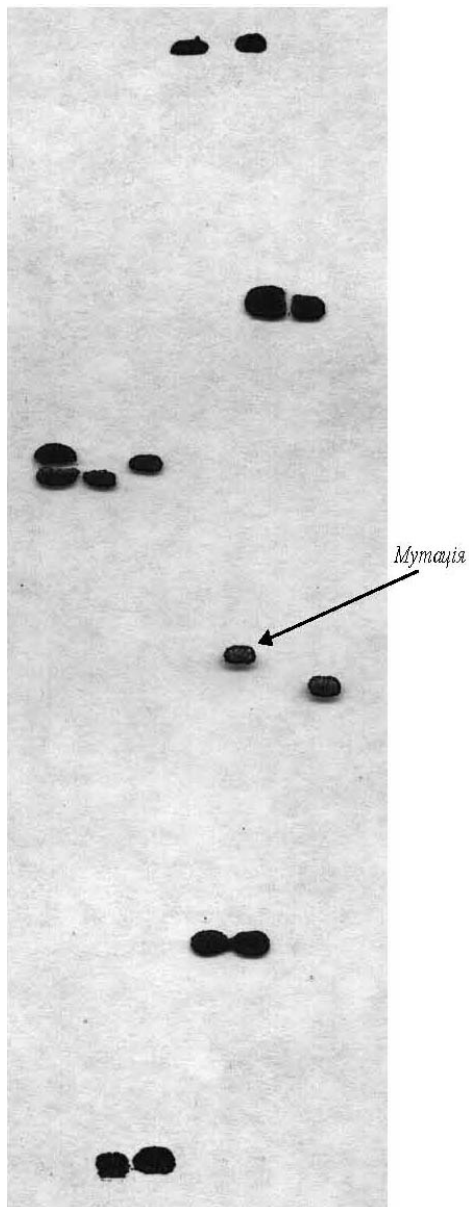


Рис. 3. Аналіз успадкованих мутацій у локусі SEB1 геному людини за допомогою методу блот-гібридизації: 1, 3, 4, 7 – батьки; 2, 6 – діти без мутацій; 5 – дитина з мутантним алелем локусу SEB1

всього 1106 мейозів – по 553 батьківських і материнських. Аналіз успадкування алейних варіантів від батьків дітьми не виявив успадкованих мутацій в жодному з цих чотирьох мінісателітних локусів. Таким чином, для різних мінісателітних локусів встановлено неоднакові мутаційні рівні – в мінісателітних локусах групи СЕВ, розміщених в субтеломерних ділянках геному, мутаційний рівень виявився набагато вищим у порівнянні з мінісателітними локусами АРОВ, РУNZ22, ІGHJ і РМСТ118.

Для встановлення рівня гаметичних мутацій (делеції/інсерції) у дев'яти аутосомних мікросателітних локусах (2AE9.1, Rep4-cf, VWF-8, VWA, FGA, TH01, D21S11, D7S820, D8S1179) нами проаналізовано успадкування алейних варіантів від батьків дітьми. За всіма мікросателітними локусами вивчено 6400 мейозів – по 3200 батьківських та материнських. Під час аналізу цих локусів зафіксовано шість успадкованих мутацій. Так, у локусі D21S11 виявлено одну мутацію материнського походження. Вона являла собою динуклеотидну делецію алеля «10» у «9», тобто протягом мейозу у матері відбулася мутація алеля розміром 231 п. н. з утворенням нового алеля розміром 229 п. н., який і був успадкований її дитиною. У локусі WVA нами виявлено дві мутації батьківського походження. Вони представляли собою тетра nukлеотидні інсерції алелів «19» у «20» (рис. 4) та «18» у «19», тобто під час сперматогенезу у батьків відбулися мутації алеля розміром 158 п. н. з утворенням нового алеля розміром 162 п. н. у першому випадку та алеля розміром 154 п. н. з утворенням нового алеля розміром 158 п. н. – у другому. В локусах 2AE.9 та D8S1179 нами зафіксовано делеції батьківського походження, а в локусі D7S820 – інсерція батьківського походження. Таким чином, за результатами наших досліджень, рівень мутацій материнського походження в локусі D21S11 становить $1,7 \cdot 10^{-3}$ (1/580). Визначені рівні мутацій батьківського походження в мікросателітних локусах були такими: WVA – $3,4 \cdot 10^{-3}$ (2/588); 2AE.9 – $8,8 \cdot 10^{-3}$ (1/114); D7S820 – $2,6 \cdot 10^{-3}$ (1/390); D8S1179 – $2,6 \cdot 10^{-3}$ (1/380).

Необхідно зазначити, що в усіх випадках біологічні батьківство та материнство підтверджувалися з імовірністю, яка перевищувала 99,99 %. Варто також зауважити, що абсолютні показники мутаційного рівня, зафіксовані нами, мають відносний характер, оскільки проаналізовану кількість мейозів не можна вважати досить репрезентативною при оцінці досить рідкісних мутаційних подій. Кумулятивні показники мутаційних рівнів, розраховані нами для всіх досліджуваних аутосомних мікросателітних локусів, становлять: $3,1 \cdot 10^{-4}$ (1/3200) та $3,6 \cdot 10^{-3}$ (5/3200) для мутацій материнського та батьківського походження відповідно.

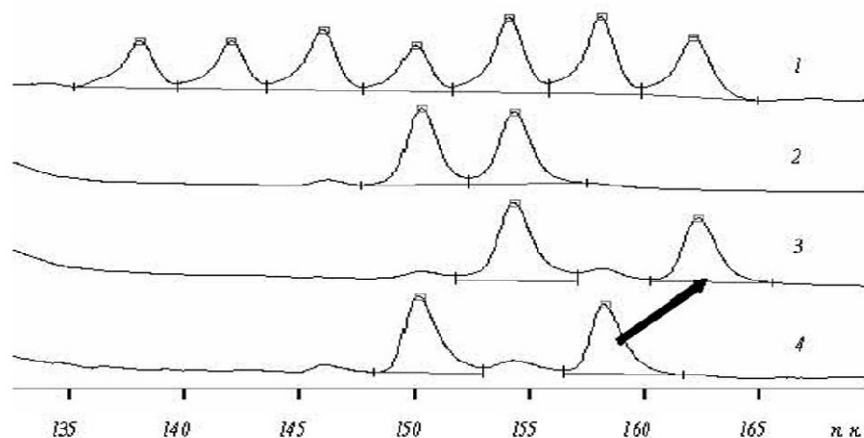


Рис. 4. Мутація в локусі WVA: 1 – маркер «алельна драбина»; 2 – мати (генотип 17/18); 3 – дитина (генотип 18/20); 4 – батько (генотип 17/19)

Щоб визначити рівень гаметичних мутацій в дев'яти STR-локусах Y-хромосоми (DYS19, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS389I, DYS389II, DYS385a/b) ми провели аналіз успадкування алельних варіантів. За всіма мікросателітними локусами Y-хромосоми проаналізовано 1953 мейозів. Виявлено делецію в локусі DYS19 та інсерції в локусах DYS390 та DYS389I. Таким чином, кумулятивний показник мутаційного рівня для мікросателітних локусів Y-хромосоми становить $1,5 \cdot 10^{-3}$ (3/1953) (www.yhrd.org/index.html).

Варто підкреслити, що всі виявлені нами мутації також мали так званий «однокроковий» характер. Ці дані узгоджуються із запропонованою SSM-моделлю, яка пояснює утворення нових алелів і, як наслідок, поліморфізму мікросателітних локусів [48].

Виходячи з визначеного нами високого рівня спонтанних мутацій, характерних для мінісателітів групи СЕВ, можна очікувати, що ці гіперваріабельні локуси є дуже цікавими не лише як об'єкт дослідження молекулярно-генетичних механізмів спонтанного мутагенезу, а й для з'ясування закономірностей індукованого мутагенезу. Можна передбачити, зокрема, що вони можуть бути використані як потенційні маркери для дослідження мутагенної дії іонізуючого випромінювання на рівні ДНК.

У цьому аспекті нами досліджено сім гіпермутабельних мінісателітних локусів групи СЕВ серед дітей, батьки яких були ліквідаторами наслідків аварії на ЧАЕС (1986–1987 рр.). Найвищу мутабельність спостерігали в локусі СЕВ1. Для цього

локусу, як зазначалося вище, в контрольній групі рівень мутацій складав 14 %. У дітей ліквідаторів мутації в цьому локусі виявлено трохи частіше: більш ніж у 15 % випадків. Таку ж тенденцію відмічено і для мутацій в локусах В6.7 та СЕВ36. Проте підвищення рівня мутацій у дітей ліквідаторів порівняно з таким у дітей контрольної групи, не є статистично достовірним. Залежності між віком батьків і виникненням мутацій батьківського походження в обох групах нами також не встановлено.

Для оцінки можливої диференційної чутливості окремих стадій розвитку чоловічих статевих клітин до мутагенного впливу іонізуючої радіації групу дітей ліквідаторів розділили на дві підгрупи. До першої увійшли діти, які були зачаті в період або не пізніше, ніж через два місяці після роботи їхніх батьків на ЧАЕС. Друга підгрупа складалася з дітей, зачаття яких відбулося більш ніж через чотири місяці після того, як закінчився термін перебування їхніх батьків на ЧАЕС. Такий розподіл базувався на тому, що період сперматогенезу триває від 64 до 73 днів. Дати народження дітей було вказано в анкетах батьків. Отримані результати засвідчили, що в підгрупі дітей, які були зачаті протягом роботи їхніх батьків на ЧАЕС, сумарний рівень мутацій батьківського походження по всіх локусах був у 1,5 разу вищим, ніж такий же показник у групі дітей, де зачаття відбулося значно пізніше після періоду опромінення їхніх батьків.

Отримані результати не дають змоги однозначно відповісти на запитання про вплив дії іонізуючої радіації на рівень успадкованих мутацій в мініса-

телітних локусах у дітей ліквідаторів аварії на ЧАЕС, народжених після 1986 року. Але якщо тенденція до зростання рівня мутацій у групі дітей, зачатих після запліднення материнських яйцеклітин сперміями, що перебували під впливом іонізуючої радіації (під час роботи батьків-ліквідаторів на ЧАЕС), не є випадковістю, то виходячи з отриманих нами даних в обох підгрупах дітей із сімей ліквідаторів можна зробити висновок, що можливий мутагенний ефект має місце лише протягом циклу сперматогенезу, тобто не торкається стовбурових статевих клітин, як це стверджують у своїх роботах Дуброва зі співавт. [44, 51].

За таких умов можна припустити, що якщо існує якийсь генетичний ефект мутагенної дії іонізуючої радіації на мінісателітні локуси геному статевих клітин, то дія його обмежується швидкоплинним періодом сперматогенезу і не є суттєвою для статевих клітин, які вступили у фазу мейозу після припинення дії іонізуючої радіації. Про це ж свідчать результати, отримані японськими вченими стосовно відсутності підвищення рівня успадкованих мутацій в мінісателітних локусах нащадків, які народилися через декілька років після того, як їхні батьки пережили атомне бомбардування в Хіросімі і Нагасакі [50].

Підсумовуючи варто зазначити, що нестабільність геному можна виявляти за допомогою аналізу повторюваних послідовностей ДНК. Внутрішньогенне розміщення багатьох повторюваних послідовностей, їхня висока варіабельність, чітко виражений менделівський тип успадкування роблять їх перспективними для цілей генетичного моніторингу мутагенних факторів довкілля, а також спадкової схильності до порушень ембріогенезу та канцерогенезу. Потік досліджень, спрямованих на оцінку мутабельності різних ділянок геному людини, вказує на те, що зацікавленість у цій проблемі не лише не згасає, а й набуває стрімкого підйому, який забезпечується новітніми методами дослідження мутацій. Накопичення експериментальних даних сімейного аналізу, впровадження сучасних методів детекції делецій/дуплікацій з використанням ПЛР у реальному часі, розробка новітніх методів математичного моделювання мутаційного процесу за розподілом частот поліморфних алелів у

різних популяціях дозволять отримати нові дані про природу та мутаційний рівень різних ділянок геному людини.

S. A. Kravchenko, L. A. Livshits

Nature and origin of germline mutations in human tandem repeated loci

Summary

The literature and own data on nature and origin of germline mutations in human hypervariable mini- and microsatellite loci have been analyzed. Possible molecular mechanisms involved in the mutation process in genomic loci with different nature are discussed.

Keywords: minisatellite and microsatellite loci, germline mutations, mutation rate.

C. A. Кравченко, Л. А. Лившиц

Природа и происхождение унаследованных мутаций в тандемно повторяющихся участках генома человека

Резюме

Проанализированы литературные и собственные данные по исследованию природы и происхождения унаследованных мутаций в гипервариабельных минисателлитных и микросателлитных локусах генома человека. Рассмотрены возможные молекулярные механизмы, вовлеченные в мутационный процесс геномных локусов разной природы.

Ключевые слова: минисателлитные и микросателлитные локусы, унаследованные мутации, мутационный уровень.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Nei M. Molecular evolutionary genetics.—New York: Columbia Univ. press, 1987.—512 p.
2. Weber J. L., Wong C. Mutation of human short tandem repeats // Hum. Mol. Genet.—1993.—2.—P. 1123–1128.
3. Vergnaud G., Mariat D., Apiou F., Aurias A., Lathrop M., Lauthier V. The use of synthetic tandem repeats to isolate new VNTR loci: cloning of a human hypermutable sequence // Genomics.—1991.—11.—P. 135–144.
4. Huang Q.-Y., Xu F.-H., Shen H. Mutation pattern at dinucleotide microsatellite loci in humans // Hum. Genet.—2002.—70.—P. 625–634.
5. Brinkmann B., Klitsch M., Neuhuber F. Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat // Am. J. Hum. Genet.—1998.—62.—P. 1408–1514.
6. Sajantila A., Lukka M., Syvanen A. C. Experimentally observed germline mutation at human micro- and minisatellite loci // Eur. J. Hum. Genet.—1999.—7.—P. 263–266.
7. Holtkemper U., Rolf B., Honoff C. Mutation rates at two human Y-chromosomal microsatellite loci using small pool PCR techniques // Hum. Mol. Genet.—2001.—10.—P. 629–633.
8. Bowcock A. M., Ruiz-Linares A., Tomfohrde J., Minch E., Kidd J. R., Cavalli-Sforza L. L. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites // Nature.—1994.—368.—P. 455–457.
9. Santibanez-Koref M. F., Gangeswaran R., Hancock J. M. Relationship between length of microsatellites and nearby

- substitution rates in mammalian genomes // *Mol. Biol. Evol.*—2001.—**18**.—P. 2119–2123.
10. Lee J. S., Hanford M. G., Genova J. L., Farber R. A. Relative stabilities of dinucleotide and tetranucleotide repeats in cultured mammalian cells // *Hum. Mol. Genet.*—1999.—**8**.—P. 2567–2572.
 11. Chakraborty R., Kimel M., Stivesr D. M. Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1997.—**94**.—P. 1041–1046.
 12. Bell G. J., Selby M. J., Rutter W. J. The highly polymorphic region near the human insulin gene is composed of simple tandemly repeating sequences // *Nature.*—1982.—**295**.—P. 31–35.
 13. Jarman A. P., Higgs D. R. A new hypervariable marker for the human alpha-globin gene-cluster // *Am. J. Hum. Genet.*—1988.—**43**.—P. 249–256.
 14. Nakamura Y. A primary map of ten DNA markers and two serological markers for human chromosome 19 // *Genomics.*—1988.—**3**.—P. 67–71.
 15. Weber J. L. Human DNA polymorphisms and methods of analysis // *Curr. Opin. Biotechnol.*—1990.—**1**.—P. 166–177.
 16. Jarman A. P., Wells R. A. Hypervariable minisatellites: recombinators innocent bystanders? // *Trends Genet.*—1989.—**5**.—P. 367–371.
 17. Freije D., Helms S., Watson M. S., Donis-Keller H. Identification of a second pseudoautosomal region near the Xq and Yq telomers // *Science.*—1992.—N 5089.—P. 1784–1787.
 18. Cooke H. J., Broun W. R., Rappold G. A. Hypervariable telomeric sequences from the human sex chromosomes are pseudoautosomal // *Nature.*—1985.—**317**.—P. 687–692.
 19. Joblin M., Tyler-Smith C. Fathers and sons: the Y chromosome and human evolution // *Trends. Genet.*—1995.—**11**.—P. 449–456.
 20. Jeffreys A., Wilson V., Thein S. Hypervariable «minisatellite» regions in human DNA // *Nature.*—1985.—**314**.—P. 67–73.
 21. Jeffreys A., Wilson V., Thein S. Individual-specific «fingerprints» of human DNA // *Nature.*—1985.—**316**.—P. 76–79.
 22. Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase // *Science.*—1988.—**239**.—P. 487–491.
 23. Weber J. L., May P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction // *Am. J. Hum. Genet.*—1989.—**44**.—P. 388–396.
 24. Koschinsky M. L., Beisiegel U., Eaton D. L. Apolipoprotein (a) size heterogeneity is related to variable number of repeat sequences in its mRNA // *Biochemistry.*—1990.—**29**.—P. 640–644.
 25. Litt M., Luty J. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene // *Am. J. Hum. Genet.*—1989.—**44**.—P. 397–401.
 26. Edwards A. I., Civitello A., Hammond H. A., Caskey C. T. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats // *Am. J. Hum. Genet.*—1991.—**49**.—P. 746–756.
 27. Brinkman B., Junge A., Meyer E. Population genetic diversity in relation to microsatellite heterogeneity // *Hum. Mutat.*—1998.—**11**.—P. 135–144.
 28. Сломинский П. А., Шадрин М. И., Лимборская С. А. Выявление белка, специфически связывающегося с триплетным повтором типа (CTG)_n // *Молекуляр. биология.*—1997.—**31**, № 1.—С. 45–48.
 29. Wang Y. H., Gellibolian R., Shimizu M. Long CCG triplet blocs exclude nucleosomes: a possible mechanism for the nature of fragile sites in chromosomes // *J. Mol. Biol.*—1996.—**263**.—P. 511–518.
 30. Гайцхоки В. С., Паткин Е. Л. Сателлитные ДНК и болезни – возможные механизмы. Тринуклеотидные повторы // *Генетика.*—2000.—**36**, № 7.—С. 869–886.
 31. Giovannucci E., Stampfer M. J., Krithivas K. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1997.—**94**.—P. 3320–3323.
 32. Jeffreys A. J. Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem-repetitive hypervariable loci in human DNA: Complex gene conversion events in germline mutation at human minisatellites // *Nature.*—1988.—**332**.—P. 278–281.
 33. Kayser M., Roewer L., Hedman M. Characteristic and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs // *Am. J. Hum. Genet.*—2000.—**66**.—P. 1580–1588.
 34. Jeffreys A., Tamaki K., MacLeod A., Monckton D., Neil D., Armour J. Complex gene conversion events in germline mutation at human minisatellites // *Nat. Genet.*—1994.—**6**.—P. 136–145.
 35. Jeffreys A., Neil D. L., Neumann R. Repeat instability at human minisatellites arising from meiotic recombination // *EMBO J.*—1998.—**17**.—P. 4147–4157.
 36. Debrauwere H., Buard J., Tessier J., Aubert D., Vergnaud G., Nicolas A. Meiotic instability of human minisatellite CEB1 in yeast requires DNA double-strand breaks [In Process Citation] // *Nat. Genet.*—1999.—**23**.—P. 367–371.
 37. Thibodeau S. N., Bren G., Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon // *Lancet.*—1993.—**260**.—P. 816–819.
 38. Jones P. A., Gonzalgo M. L. Altered DNA methylation and genome instability: A new pathway to cancer? // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1997.—**94**.—P. 2103–2105.
 39. Bapat B. V., Madlensky L., Temple L. K. Family history characteristics, tumor microsatellite instability and germline MSH2 and MLH1 mutations in hereditary colorectal cancer // *Hum. Genet.*—1999.—**104**.—P. 167–176.
 40. Heale S. M., Retes T. D. The stabilization of repetitive tracts of DNA by variant repeats requires a functional DNA mismatch repair system // *Cell.*—1995.—**83**.—P. 539–545.
 41. Wierdl M., Dominika M., Petes T. D. Microsatellite instability in yeast: dependence on the length of the microsatellite // *Genetics.*—1997.—**146**.—P. 769–779.
 42. Xu X., Peng M., Fang Z., Xu X. The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length // *Nat. Genet.*—2000.—**24**.—P. 396–399.
 43. Livshits L. A., Malyarchuk S. G., Lukyanova E. M., Antipkin Y. G., Arabskaya L. P., Kravchenko S. A., Matsuka G. H., Petit E., Giraudeau F., Gourmelon P., Vergnaud G., Le Guen B. Children of Chernobyl cleanup workers do not show elevated rates of mutations in minisatellite alleles // *Radiat. Res.*—2001.—**155**.—P. 74–80.
 44. Dubrova Y., Nesterov V., Krouchinsky N., Ostapenko V., Neumann R., Neil D. L., Jeffreys A. J. Human minisatellite mutation rate after the Chernobyl accident // *Nature.*—1996.—**360**.—P. 683–686.
 45. Фогель Ф., Мотульски А. Генетика человека (в 3 т.).—М.: Мир, 1990.
 46. Rolf B., Brinkmann B. Reply to Henke and Henke // *Am. J. Hum. Genet.*—1999.—**64**.—P. 1473–1474.
 47. Hurst L. D., Ellegren H. Sex biases in the mutation rate // *Trends Genet.*—1998.—**14**.—P. 446–452.
 48. Kimura M., Ohta T. Distribution of allelic frequencies in a finite population under stepwise production of neutral alleles // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1975.—**72**.—P. 2761–2764.
 49. Никитина Т. В., Назаренко С. А. Мутации в микросателлитных повторах ДНК и эмбриональная гибель у человека // *Генетика.*—2000.—**36**, № 7.—С. 965–971.

50. Kodaira M., Satoh C., Hiyama K., Toyama K. Lack of effects of atomic bomb radiation on genetic instability of tandem-repetitive elements in human germ cells // *Am. J. Hum. Genet.*—1995.—**57**.—P. 1275–1283.
51. Dubrova Y. E., Nesterov V. N., Krouchinsky N. G. Further evidence for elevated human minisatellite mutation rate in Belarus eight years after the Chernobyl accident // *Mutat. Res.*—1997.—**381**.—P. 267–278.
52. Dubrova Y. E., Bersimbaev R. I., Djansugurova M. K. Nuclear weapons tests and human germline mutation rate // *Science*.—2002.—N 5557.—P. 1037.
53. Chen X., Stroun M., Magnenat J. L. Microsatellite alterations in plasma DNA of small lung cancer patients // *Nat. Med.*—1996.—**2**.—P. 1033–1035.
54. Rush E. B., Calvano J. E., van Zee K. J. Microsatellite instability in breast cancer // *Ann. Surg. Oncol.*—1997.—**4**.—P. 310–315.
55. Spandidos D. A., Koumantakis E., Sifakis S. Microsatellite mutations in spontaneously aborted embryos // *Fertility and Sterility*.—1998.—**5**.—P. 892–895.
56. Никитина Т. В., Лебедев И. Н., Суханова Н. Н., Назаренко С. А. Гаметические мутации тетрануклеотидных повторов ДНК в норме и патологии раннего периода онтогенеза человека // *Генетика*.—2005.—**41**, № 7.—С. 943–953.
57. Животовский Л. А. Статистические методы анализа частот генов в природных популяциях // *Итоги науки и техники*.—М.: ВИНТИ, 1983.—Т. 8.—С. 76–104.
58. Loeb L. A. Cancer cells exhibit a mutator phenotype // *Adv. Cancer Res.*—1998.—**72**.—P. 25–56.
59. Amarger V., Gauguier D., Yerle M., Apiou F., Pinton P., Giraudeau F., Monfouilloux S., Lathrop M., Dutrillaux B., Buard J., Vergnaud G. Analysis of the human, pig, and rat genomes supports a universal telomeric origin of minisatellite sequences // *Genomics*.—1998.—**52**.—P. 62–71.
60. Kimpton C. P., Hopgood R., Watson S. K., Gill P., Sullivan K. Cloning and characterisation of novel single locus probes for forensic purposes // *Adv. Forensic Haemogenet.*—1992.—**4**.—P. 129–131.

УДК 577.21+575.857
Надійшла до редакції 24.05.07