

GENOTYPE –
PHENOTYPE
INTERRELATION
AS A PROBLEM
OF MOLECULAR
GENETICS OF HUMAN
INHERITED DISEASES

V. S. GAITSKHOKI

The molecular genetic approaches to the analysis of genotype – phenotype interrelations in human inherited diseases are described. The transacting mutations and some variants of the suppression of gene mutations at the levels of biochemical phenotype and clinical manifestations are characterized.

Рассмотрены молекулярно-генетические подходы для исследований взаимоотношений генотип – фенотип при наследственных болезнях человека. Охарактеризованы транс-действующие мутации и некоторые варианты супрессии генных мутаций на уровнях биохимического и клинического фенотипов.

**ВЗАИМООТНОШЕНИЕ
ГЕНОТИП–ФЕНОТИП
КАК ПРОБЛЕМА
МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ
НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ
ЧЕЛОВЕКА**

В. С. ГАЙЦХОКИ

Санкт-Петербургский государственный
технический университет

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА – НОВАЯ ЭРА
В ИЗУЧЕНИИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПАТОЛОГИИ**

Молекулярная генетика наследственных болезней – это относительно молодая отрасль молекулярной медицины. Ее зарождение связано с разработкой нового методического арсенала (методическая революция 70-х годов), который предоставил исследователям возможность выделения индивидуальных генов путем их молекулярного клонирования, химического анализа нуклеотидных последовательностей ДНК, конструирования новых генетических структур, изучения механизмов экспрессии генов и ее регуляции. В рамках этого направления сделаны фундаментальные открытия, которые существенно изменили традиционные представления о структуре генов, их организации в геноме и взаимоотношениях ген – белок, ген – признак и генотип – фенотип.

Методическая революция 70-х годов имела следствием не только усовершенствование техники генетического анализа и увеличение его разрешающей способности, но и принципиальные изменения методологии современной генетики. Классическая генетика имеет дело с анализом фенотипических признаков разной степени сложности (структура и функциональная активность белков, морфологические признаки, клинические проявления болезней и т.д.), их сцепления и мутационных изменений. При этом изменения признаков трактуются как следствие мутаций соответствующих генов, а идентификация нормального гена, как правило, основана на обнаружении его мутантных (полиморфных) аллелей. Такая стратегия генетических исследований (“от признака к гену” и “от мутантного аллеля к нормальному гену”) характерна для всего предшествующего периода развития генетики человека.

Разработка принципиально новых методических подходов коренным образом изменила общую стратегию медико-генетических исследований. Во-первых, ген стал основным объектом исследования и изменения его структуры выявляются не дедуктивно

(по фенотипическому проявлению), а путем непосредственного химического анализа первичной структуры ДНК. Во-вторых, появилась возможность структурного анализа клонированных аллелей дикого типа, то есть нормальных генов. А это обстоятельство имеет два существенных следствия: 1) дедуктивное определение аминокислотных последовательностей неизвестных белков на основании первичной структуры клонированного гена и 2) обнаружение мутантных аллелей путем прямого сопоставления первичных структур нормального гена и его мутантов.

Эта принципиально новая стратегия генетических исследований, особенно важная для изучения генома человека и основ наследственных болезней, может быть сформулирована в форме общих принципов “от гена к белку” и “от нормального гена к мутантному аллелю”. В целом это направление иногда в литературе называют “обратная генетика”, что подчеркивает принципиальное различие методологий классической (прямой) и молекулярной (обратной) генетики. Совершенно очевидно, что в применении к изучению наследственных болезней эти два разных направления не должны противопоставляться. Между ними нет антагонизма. Наоборот, только комплексное (молекулярное, биохимическое, клиническое) исследование наследственных дефектов будет способствовать решению таких важных фундаментальных и прикладных проблем, как выяснение молекулярных основ этиологии и патогенеза моногенных наследственных болезней, идентификация генетических факторов риска распространенных болезней, пренатальная и прееклиническая диагностика и профилактика наследственной патологии, наконец, генная терапия как способ ее радикальной коррекции. В то же время с позиций обратной генетики требуются уточнение и конкретизация некоторых терминов и понятий, привычных и достаточных для трактовки сложных и вариабельных взаимоотношений генотип – фенотип с точки зрения классической генетики.

ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА – ОБЩИЙ ВЗГЛЯД

Наиболее последовательное воплощение принципы обратной генетики нашли в грандиозном международном проекте “Геном человека”, основная цель которого – полное определение первичной структуры геномной ДНК человека (размер гаплоидного генома – 3,5 млрд нуклеотидных пар). Реализация этого проекта должна привести к идентификации всех генов человека, а затем (в соответствии с принципом “от гена к белку”) и их белковых продуктов. Следствием этих достижений должно стать выяснение природы всех первичных генных дефектов, вызывающих различные формы наследственной патологии или предрасполагающих к ней (в соответствии с принципом “от нормального гена к мутантному аллелю”). На сегодня идентифициро-

ваны (без определения полной первичной структуры) около 70% генов человека, активных в различных тканях (экспрессируемых). Предполагается, что общее количество генов человека составляет 80 тыс. (во всяком случае не более 100 тыс.), а это соответствует примерно 10% содержания ДНК в гаплоидном геноме человека. В настоящее время на основе этих данных удалось предварительно разделить идентифицированные гены на несколько групп в зависимости от функциональной роли их белковых продуктов в клеточном “хозяйстве” и многоклеточном организме. Эти результаты суммированы ниже.

Функции генов	%
Метаболизм	17
Экспрессия генов (из них транскрипционные факторы)	22 10
Сигнализация—коммуникация клеток	12
Структура и подвижность клеток	8
Гомеостаз и защитные механизмы клеток и организма	12
Деление клеток и синтез ДНК	4
Функция неизвестна	25

Из приведенных данных видно, что, во-первых, гены, кодирующие белки-ферменты клеточного метаболизма, составляют неожиданно малую группу известных генов (17%). В то же время 22% генов – это гены для белков и РНК, являющихся компонентами аппарата экспрессии генов и регуляторами ее различных стадий. Половину этого общего числа составляют гены регуляторных белков – активаторов и репрессоров (так называемых транс-действующих факторов), контролирующих транскрипцию генов для белков, которые формируют специфические фенотипы клеток и тканей в ходе развития и дифференцировки.

НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ – ОБЪЕКТ ОБРАТНОЙ ГЕНЕТИКИ

Каталог моногенных признаков человека, наследуемых в соответствии с законами Менделя (болезни и нейтральные признаки), который периодически издается американским генетиком В. МакКьюсином, насчитывает более 4 тыс. наименований [1]. Из них несколько сот болезней можно связать с нарушениями дискретных биохимических функций. К ним относятся гемоглобинопатии, энзимопатии, дефекты систем свертывания крови и фибринолиза, коллагенопатии, лизосомальные болезни накопления. Примерно такое же количество наследственных болезней исследуется в настоящее время методами обратной генетики. Их число постоянно увеличивается в связи с прогрессом молекулярного анализа генома человека. В применении к наследственной патологии большую роль играет стратегия

позиционного клонирования, сочетающая подходы классической и молекулярной генетики. Она основана на первоначальном установлении локализации локуса болезни на хромосомах с последующим выделением фрагментов ДНК из этого локуса и определением их нуклеотидных последовательностей (секвенированием) и обнаружением патологических мутаций при наследственной болезни. Этот подход успешно реализован при идентификации генов, мутации которых вызывают муковисцидоз, мышечную дистрофию Дюшенна, болезнь Гентингтона, гепатолентикулярную дегенерацию (болезнь Вильсона), болезнь Менкеса, синдром Марфана и другие нозологические формы. Позиционное клонирование является эффективным методом обратной генетики, дополняющим принцип тотального секвенирования генома. На основании мирового опыта молекулярного анализа наследственных болезней можно предложить схему взаимоотношений между генотипом, его биохимическими проявлениями (биохимический фенотип) и клинической картиной наследственных болезней (клинический фенотип), которые будут предметом дальнейшего изложения (рис. 1).

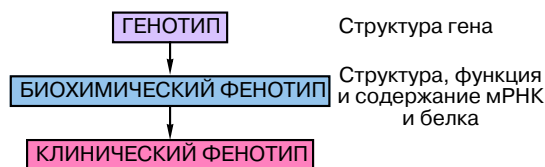


Рис. 1. Общая схема взаимоотношения между генотипом и биохимическим и клиническим фенотипами болезни

ДЕФЕКТЫ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

Значительный прогресс достигнут в области изучения молекулярно-генетических основ довольно большой группы наследственных болезней, биохимический фенотип которых – это либо частичный дефицит какого-либо белка без его структурных и функциональных аномалий, либо полное отсутствие белка (соответственно плюс- и нуль-формы наследственных дефицитов). Молекулярный анализ мутантных аллелей соответствующих генов показал, что эти дефекты экспрессии имеют в основе генные делеции различной протяженности, нонсенс-мутации (превращения смысловых кодонов в бессмысленные, или стоп-кодоны) и мутации со сдвигом рамки считывания (появление или делеция одного или нескольких нуклеотидов, число которых не кратно трем, в результате чего нарушается последовательность кодонов в мРНК), а также большой класс неизвестных ранее мутаций, нарушающих структуру экспрессионных сигналов (коротких нуклеотидных последовательностей в генах

или мРНК, обеспечивающих точность и специфичность различных стадий экспрессии гена), в частности промоторов, границ экзонов (кодирующих участков) и интронов (вставочных последовательностей), сигналов формирования 3'-концов зрелых мРНК и образования зрелых белков из их предшественников – первичных продуктов трансляции мРНК рибосомами.

ТРАНС-ДЕЙСТВУЮЩИЕ МУТАЦИИ

Существует довольно большое количество наследственных дефицитов индивидуальных белков или групп функционально родственных белков, имеющих моногенную природу и наследуемых в соответствии с законами Менделя, которые не ассоциированы с какими-либо изменениями структуры генов, кодирующих эти белки. Такого рода вторичные, но специфические и патогенетически существенные дефициты белков часто являются фенотипическим выражением мутаций в генах, белки-продукты которых сами по себе не контролируют каких-либо явных фенотипических проявлений, например биохимических реакций (генах-модификаторах в терминах классической генетики). Для обозначения группы мутаций, локализованных вне гена, но нарушающих его нормальную (в количественном и качественном отношении) экспрессию и вызывающих клинические аномалии, можно предложить термин «транс-действующие мутации» (в связи с тем, что эти гены кодируют транс-действующие белковые факторы, необходимые для адекватной экспрессии генов-мишеней и взаимодействующие с регуляторными цис-элементами ДНК). Гены этой группы кодируют компоненты аппарата генной экспрессии (например, белки-регуляторы транскрипции, белки системы образования активной мРНК из РНК – первичного транскрипта гена, белки-ферменты, катализирующие созревание белков и их адекватный внутриклеточный транспорт после их синтеза на рибосомах). На рис. 2 представлена принципиальная схема экспрессии гена (от гена до признака), каждый этап которой контролируется большим количеством белков. Часть их необходима для нормальной экспрессии всех генов, часть – для образования полноценных индивидуальных белков или групп белков, объединяемых общей функцией или внутриклеточной локализацией. Наконец, существует большая группа генов, контролирующих молекулярную программу включения и исключения различных групп генов в онтогенезе. Мутации этих генов вызывают множественные и разнообразные по фенотипу синдромы нарушения эмбрионального развития. Белки-продукты всех этих генов можно обобщенно назвать транс-действующими факторами, а их мутации, вызывающие вторичные, но специфические аномалии биохимического и клинического фенотипа – транс-действующими мутациями. Классификация транс-действующих

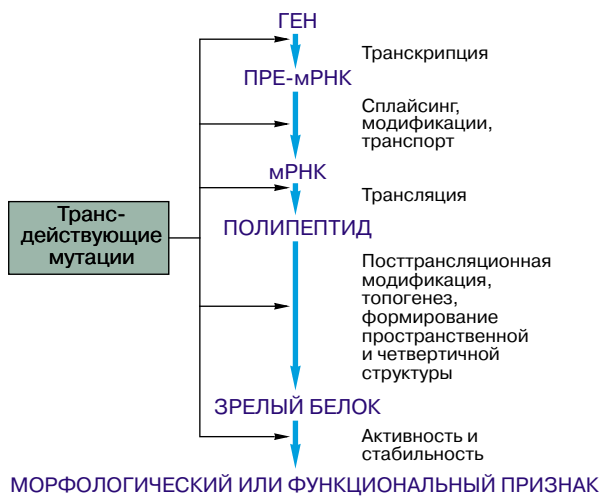


Рис. 2. Основные стадии экспрессии генов и уровни проявления транс-действующих мутаций

факторов по функциональному признаку приведены ниже.

1. Факторы транскрипции
2. Факторы сплайсинга
3. Факторы трансляции
4. Ферменты посттрансляционной модификации
5. Морфогенетические белки органелл
6. Молекулярные шапероны

Из общего количества идентифицированных генов человека 22% приходится на гены этой группы, кодирующие различные транс-действующие факторы, половину которых составляют факторы-регуляторы транскрипции. К этому следует добавить большую группу белков, участвующих в сложных процессах внутриклеточной передачи сигналов. Гены для этих белков составляют 12% идентифицированных генов человека. В связи с этим можно полагать, что транс-действующие мутации должны вносить существенный вклад в наследственную патологию.

Для некоторых транс-действующих мутаций структурно идентифицированы мутантные аллели и выяснена ассоциация их аномалий с определенными клиническими синдромами или специфическими дефицитами индивидуальных белков. В качестве примера можно привести мутации генов-регуляторов транскрипции, вызывающие множественные нарушения формирования органов и функциональных систем в эмбриогенезе. Групповые дефициты белков-ферментов внутриклеточных органелл (лизосом, пероксисом), не связанные с аномалиями структуры генов, кодирующих эти белки, могут быть связаны с транс-действующими мутациями, локализованными в генах трех групп. Во-первых, это морфогенетические белки органелл, сами по се-

бе не обладающие какой-либо ферментативной активностью, но необходимые для формирования органелл и внутриклеточного транспорта ферментов в эти органеллы. Во-вторых, это белки-активаторы лизосомальных ферментов. В-третьих, это ферменты, катализирующие специфические реакции модификации, которая необходима для функционирования определенных групп ферментов. Например, групповой дефицит лизосомальных сульфатаз, обусловленный недостаточностью фермента уникальной модификации специфического остатка цистеина в активных центрах сульфатаз (подробнее см. [2]).

Примером своего рода транс-действующей мутации является гепатолентикулярная дегенерация (болезнь Вильсона–Коновалова), биохимический фенотип которой – это выраженный дефицит медь-транспортного белка плазмы крови церулоплазмينا. В то же время первичный дефект при этой патологии локализован не в гене церулоплазмينا, а в сцепленном с ним гене, который кодирует мембранный белок со свойствами медь-транспортной АТФазы. Связь мутаций этого гена с количественным дефицитом церулоплазмينا и клиническим симптомом комплексом пока не выяснена.

О других транс-действующих мутациях информация носит скорее негативный характер (констатируется дефицит белка при отсутствии функционально значимых изменений структуры кодирующих последовательностей гена и его регуляторных цис-элементов). Так, наследственный дефицит аполиipoproteина А-1 (апоА1), не сцепленный с изменениями структуры гена апоА1, скорее всего, имеет в основе недостаточность ферментов, катализирующих созревание апоА1 из его предшественника. Большинство случаев семейной болезни Альцгеймера, которая проявляется как гиперпродукция β-амилоидного пептида, сцеплены с мутациями в генах, кодирующих белки-пресенилины, функции которых, и в частности, роль в образовании амилоидных отложений, не установлены.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СУПРЕССИИ ГЕННЫХ МУТАЦИЙ

Приведенные примеры транс-действующих мутаций иллюстрируют известное положение генетики о том, что экспрессия гена контролируется не только его нуклеотидными последовательностями, но и экстрагенными факторами, которые могут нарушать генную экспрессию при отсутствии структурных изменений самого гена. Формально сходные механизмы могут лежать в основе противоположной ситуации – нормализации (частичной или полной) биохимического и клинического фенотипа наследственных болезней, то есть супрессии фенотипа генной мутации.

Природа факторов, супрессирующих действие мутантных генов, и молекулярные механизмы супрессии исследованы пока недостаточно, но эти

феномены, несомненно, представляют интерес для понимания цепочки взаимоотношений между мутациями, вызывающими моногенные заболевания с конкретными типами наследования, и их проявлениями на уровне биохимического и клинического фенотипов. Более того, эффекты дополнительных внутри- и внегенных факторов (модификаторов и супрессоров в терминах классической генетики) играют весьма существенную роль в реализации эффектов генов предрасположенности к некоторым распространенным заболеваниям полигенной (мультифакториальной) природы, которая в общем виде рассматривается как результат взаимодействий ген – ген. Для иллюстрации этого общего положения можно привести некоторые конкретные примеры.

Транскрипционная супрессия

На основании фактического материала можно обсуждать по меньшей мере два механизма транскрипционной супрессии генных мутаций, то есть частичной нормализации транскрипции мутантных генов. Во-первых, это супрессия промоторных мутаций по механизму дублирования сходных функций множественными цис-элементами промотора и взаимодействующими с ними транс-активаторами. Пример такого рода супрессии промоторной мутации – это одна из форм гемофилии В [3]. Она вызвана мутацией промотора гена фактора IX свертывания крови и характеризуется практически пол-



Вариант гемофилии В	Промоторная мутация	Возрастная супрессия
Leiden	T → A (-20)	Есть
Brandenburg	G → C (-26)	Нет

Рис. 3. Промоторные мутации гена фактора IX свертывания крови (по [3]). Представлена нуклеотидная последовательность участка промоторной зоны гена фактора IX свертывания крови (координаты –43/–8, нуклеотиды пронумерованы в 5'-направлении от старта транскрипции) и точковые замены при промоторных формах гемофилии В. Подчеркнуты перекрывающиеся цис-элементы связывания рецептора андрогенов (верхняя линия) и фактора LF/HNF-1 (нижняя линия), которые регулируют активность промотора гена фактора IX. Возрастная супрессия недостаточности фактора IX ассоциирована с нормальной структурой элемента реакции на андрогены (вариант Leiden). Мутация, нарушающая структуру обоих цис-элементов, не супрессируется (вариант Brandenburg)

ным блоком транскрипции этого гена в раннем возрасте и ее существенной нормализацией (до 60% нормы) в период полового созревания, коррелирующей с нормализацией свертывания крови (рис. 3).

Другой вариант транскрипционной супрессии мутантного аллеля продемонстрирован в работах по изучению молекулярных основ наследственного дефицита полноразмерного аполипопротеина В (апоВ100) – белкового компонента липопротеидных частиц плазмы крови. Показано, что мутантный нуль-аллель гена апоВ с делецией одного нуклеотида и сдвигом рамки считывания может экспрессироваться с образованием полноразмерного белка-продукта с эффективностью до 10% в результате воспроизводимой транскрипционной ошибки – вставки одного нуклеотида с восстановлением рамки считывания (рис. 4). Структурная основа этой ошибки транскрипции – формирование в делеционном аллеле гена апоВ непрерывного тракта из восьми остатков А [4]. Известно, что короткие гомополинуклеотидные тракты ДНК считываются РНК-полимеразами с недостаточной точностью (феномен “скольжения” или “спотыкания” фермента), в результате чего образуется часть молекул РНК-транскриптов со вставкой А, восстанавливающей рамку считывания.

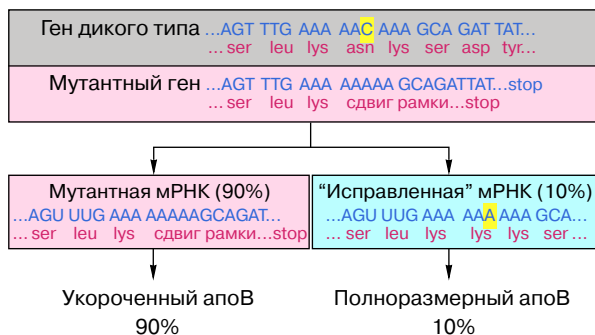


Рис. 4. Транскрипционная супрессия мутации со сдвигом рамки в гене аполипопротеина В (по [4]). Приведены нуклеотидные последовательности участков гена апоВ дикого типа и его мутантного аллеля с делецией одного остатка С, а также мутантной и “исправленной” апоВ-мРНК. Желтым цветом выделены остаток С нормального гена апоВ, отсутствующий в его мутантном аллеле, и остаток А, появляющийся в мутантной апоВ-мРНК в результате транскрипционной супрессии

Супрессия на уровне образования зрелой мРНК

Известно, что наиболее частая причина недостаточности альфа-1-антитрипсина (АТ) – основного ингибитора протеолитических ферментов – это гипосекреторный Z-аллель гена АТ, имеющий клинические проявления двух типов: 1) постепенное развитие эмфиземы легких вследствие неконтролируемого разрушения эластических волокон

легочных альвеол, которое обусловлено дефицитом циркулирующего АТ, и 2) неспецифический гепатит и цирроз печени, ведущие к гибели ZZ-гомозигот в первые годы жизни и обусловленные накоплением в печени АТ и реактивным воспалением. Предрасположенность к патологии печени носит семейный характер и контролируется, по-видимому, какими-то дополнительными генетическими факторами. В наших работах описана семья, в которой два родных брата (ZZ-гомозиготы) существенно различались по клиническим проявлениям болезни: у одного из них наблюдался типичный печеночный вариант дефицита АТ, а другой к моменту исследования был здоров. Молекулярный анализ мутантных аллелей гена АТ показал, что у здорового брата, наряду с гомозиготной ZZ-мутацией имеется гетерозиготная мутация в гене АТ, возникшая de novo, то есть отсутствующая у обоих родителей и больного брата. Эта мутация (точковая замена С → Т) локализуется на 3'-конце интрона IV в консервативном участке, необходимом для правильного сплайсинга АТ-мРНК (вырезания вставочной интронной последовательности и формирования непрерывной кодирующей зоны мРНК). Следствием такой интронной мутации является блок образования АТ-мРНК и снижение ее концентрации в клетках печени, ведущее к снижению внутриклеточного накопления мутантного Z-АТ и супрессии клинического фенотипа гепатита и цирроза печени.

По-видимому, супрессия (внутригенная или экстрагенная) патологических проявлений генных мутаций в фенотипе — довольно частое явление, поскольку при семейном анализе систематически обнаруживаются родственники больных — носители мутантных аллелей, не имеющие специфических клинических аномалий. Примеры такого рода обнаружены нами в ходе обследования родословных с семейной гиперхолестеринемией — доминантной недостаточностью белка-рецептора липопротеинов низкой плотности (ЛНП). В одном из таких случаев продемонстрированы наличие протяженной делеции в гене рецептора ЛНП и специфический биохимический фенотип болезни, не ассоциированный с главными клиническими проявлениями — коронарной недостаточностью и ранними инфарктами миокарда [5]. В кровотоке больной наряду с повышением концентрации атерогенных ЛНП отмечено существенное увеличение содержания липопротеинов высокой плотности (ЛВП), обладающих антиатерогенной активностью. По данным предварительного семейного анализа, высокое содержание ЛВП детерминировано какими-то генетическими факторами и наследуется в поколениях как признак, не сцепленный с мутацией гена рецептора ЛНП.

В целом можно заключить, что даже при моногенных формах наследственной патологии с относительно простыми вариантами наследования изучение взаимоотношений в системе генотип—фенотип должно учитывать влияние дополнительных (внутригенных или внегенных) факторов (модификаторов и супрессоров в терминах классической генетики) на функциональные последствия генной мутации. Тем более этот аспект молекулярной генетики представляется важным для понимания механизмов действия генетических факторов предрасположенности к распространенным заболеваниям.

Материалы, приведенные в статье, показывают, что проблема множественных вариантов взаимоотношений генотип — фенотип остается актуальной для молекулярно-генетического анализа наследственных болезней человека, в частности для понимания в молекулярных терминах некоторых понятий классической генетики. Эта проблема имеет существенное значение для понимания взаимосвязей генотипа с фенотипическими проявлениями моногенных мутаций и для выяснения генетических основ распространенных болезней (сахарный диабет, эссенциальная гипертензия, бронхиальная астма, некоторые психические болезни, семейные формы злокачественных опухолей), характеризующихся полигенным типом наследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mendelian Inheritance in Man: Catalogs of Autosomal Dominant, Autosomal Recessive and X-linked Phenotypes / Ed. V.A. McKusick. 10 ed. Baltimore; L.: Johns Hopkins Univ. Press, 1992.
2. Гайцхоки В.С. // Вестн. РАМН. 1996. № 9. С. 8—14.
3. Crossier M., Ludwig M., Stowell K.M. // Science. 1992. Vol. 257. С. 377—379.
4. Linton M., Pierotti V., Young S.G. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1992. Vol. 89. P. 11431—11435.
5. Mandelshtam M.Ju., Lipovetsky B.M., Schwartzman A.L., Gaitskhoki V.S. // Hum. Mutation. 1993. Vol. 2. P. 256—260.

* * *

Владимир Соломонович Гайцхоки, доктор медицинских наук, член-корреспондент РАМН, профессор кафедры биофизики Санкт-Петербургского государственного технического университета, руководитель отдела молекулярной генетики Института экспериментальной медицины РАМН, председатель Санкт-Петербургского отделения Российского биохимического общества РАН, руководитель ведущей научной школы России “Изучение генетических дефектов мембранных белков человека”. Основные научные интересы: молекулярная генетика наследственных болезней, генетические дефекты мембранных белков. Автор более 250 научных работ, в том числе двух монографий.