

# ГЛАВА 12

## 12.1. СПАДКУВАННЯ МОНОГЕННИХ ХВОРОБ НЕ ЗА ЗАКОНАМИ МЕНДЕЛЯ

Існують моногенні хвороби, передавання яких від батьків потомству не підпорядковується класичним законам Менделя.

### 1. Хвороби, зумовлені мутаціями у вигляді триплет-повторів (про сутність таких мутацій дивіться вище).

Прикладом може бути *синдром ламкої X-хромосоми*, який клінічно виявляє себе уповільненням розумового розвитку та характерними змінами скелета, статевих та інших органів. За частотою розвитку слабоумства він посідає друге після синдрому Дауна місце (1:1550 в осіб чоловічої статі і 1:8000 – у жінок). Таку назву цей синдром отримав тому, що при спеціальних методах фарбування в X-хромосомі виявляють незабарвлені зони, що імітують місця облomu хромосом.

Сьогодні показано, що в такій ділянці X-хромосоми міститься патологічно змінений ген FMR-1 (familial mental retardation). Нормальний ген FMR-1 містить в одній зі своїх кінцевих ділянок, що не транслюються, від 10 до 55 (у середньому 29) повторів триплету CGG. Збільшення кількості таких повторів (*ампліфікація*) від 55 до 200 нічим фенотипово себе не виявляє, але особи, що мають такий мутантний ген, стають його носіями і можуть передавати дефект у наступні покоління. Таку ампліфікацію позначають ще терміном *премутація*.

Хвороба з усіма клінічними ознаками виникне тільки тоді, коли кількість триплет-повторів становитиме від 200 до 4000. Такий стан гена позначають як *повну мутацію*. Одна з особливостей спадкування синдрому пов'язана з тим, що перехід премутації в повну мутацію відбувається в яйцеклітинах жіночого організму під час оогенезу.

#### Відмінності від класичного, зчепленого з X-хромосоною, успадкування полягають у тому, що:

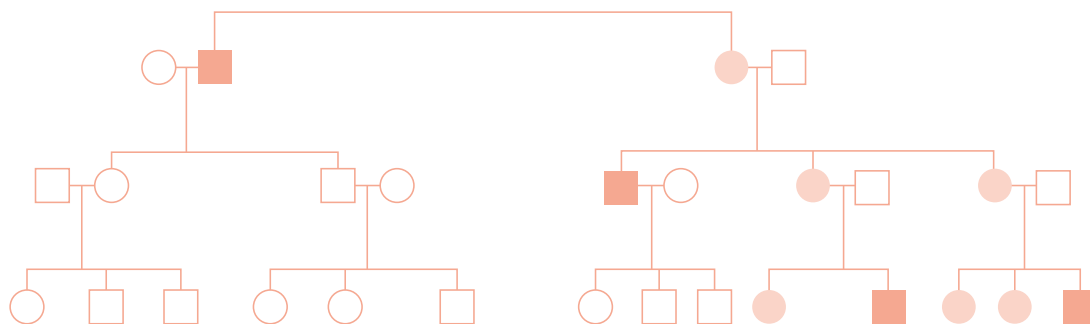
- першим передавачем патологічного гена (премутації) є здоровий чоловік, він передає його всім своїм дочкам;
- у дочок під час оогенезу відбувається перехід премутації в повну мутацію;
- у третьому поколінні 50 % дітей чоловічої статі отримають повну мутацію і матимуть хворобу, а з тих осіб жіночої статі, до яких перейшов патологічний ген, у половини виникатиме хвороба (щоправда менш виражена, ніж у чоловіків), а в половини – ні.

Вважають, що збільшення кількості триплетів у нетрансльованій кінцевій ділянці FMR-1-гена призводить до ненормального метилювання азотистих основ молекули ДНК, яке поширюється і на ділянку промотора. Як наслідок, унеможлиблюється транскрипція гена і не утворюється FMR-білок. Останній виконує в нормі важливу регуляторну функцію у відростках (аксонах і дендритах) нейронів головного мозку: він впливає на процеси синтезу речовин, що беруть участь у здійсненні синаптичної передачі.

## 2. Хвороби, зумовлені мутаціями в мітохондріальних генах.

Переважаюча більшість генів еукаріотів міститься в хромосомах клітинного ядра. Проте дуже невелика їх частина (у людини таких 37) локалізована в мітохондріальній ДНК. З цієї кількості тільки 13 кодують інформацію про структуру деяких компонентів дихального ланцюга мітохондрій (див. главу 21). Мутації, що виникають у мітохондріальних генах, як правило, виявляють себе порушеннями клітинного дихання і окисного фосфорилування, а оскільки ці процеси найактивніше відбуваються в клітинах центральної нервової системи, скелетних і серцевому м'язях, печінці і нирках, то саме ці органи стають об'єктом уражень.

Особливість спадкування «мітохондріальних хвороб» полягає в тому, що в зиготу потрапляють мітохондрії виключно з яйцеклітиною, позаяк сперматозоїди, будучи практично позбавлені цитоплазми, майже не містять цих органел. Отже, спадкування патологічних мітохондріальних генів відбувається по материнській лінії: усі діти обох статей отримують від матері ген, але передавати його далі можуть тільки особини жіночої статі («цитоплазматичне спадкування») (рис. 12.11).



**Рис. 12.11.** Умовний родовід хворих на хворобу Лебера, пов'язану з мутаціями в мітохондріальній ДНК

Під час поділу клітин мітохондрії та їхня ДНК розподіляються між дочірніми клітинами у випадковий спосіб, без будь-якої закономірності. Це означає, що при поділі клітини, яка містить мітохондрії з нормальною і мутантною ДНК, дочірні клітини можуть їх отримувати в абсолютно різних пропорціях.

Слід зауважити, що кожна мітохондрія містить тисячі молекул ДНК, а шкідливі мутації виникають лише в деяких з них. Звісна річ, що порушення діяльності мітохондрій виникатимуть тільки тоді, коли кількість відповідних мутантних генів досягне певної критичної (порогової) величини. Мабуть, у зв'язку з цим *мітохондріальні хвороби* трапляються дуже рідко. Прикладом таких може бути *спадкова нейропатія зорового нерва (хвороба Лебера)*.

## 3. Хвороби, пов'язані з геномним імпринтингом.

Добре відомо, що в організмі є по дві копії кожного гена, розміщені в гомологічних хромосомах, одна з яких материнського, а друга – батьківського походження. Загалом вважалося, що функціонально ці гени не відрізняються між собою. Проте останні дослідження показали, що принаймні для деяких генів існують функціональні відмінності між генами материнського і батьківського походження. Ці відмінності зумовлені позагеномними регуляторними впливами, що отримали назву *геномного імпринтингу*.

У більшості випадків імпринтинг вибірно інактивує або материнський, або батьківський алель. Таким чином, материнський імпринтинг означає, що відповідний ген в материнському алелі «мовчить», тобто на ньому не відбувається транскрипція. Аналогічно при батьківському імпринтингу інактивованою є батьківський алель.

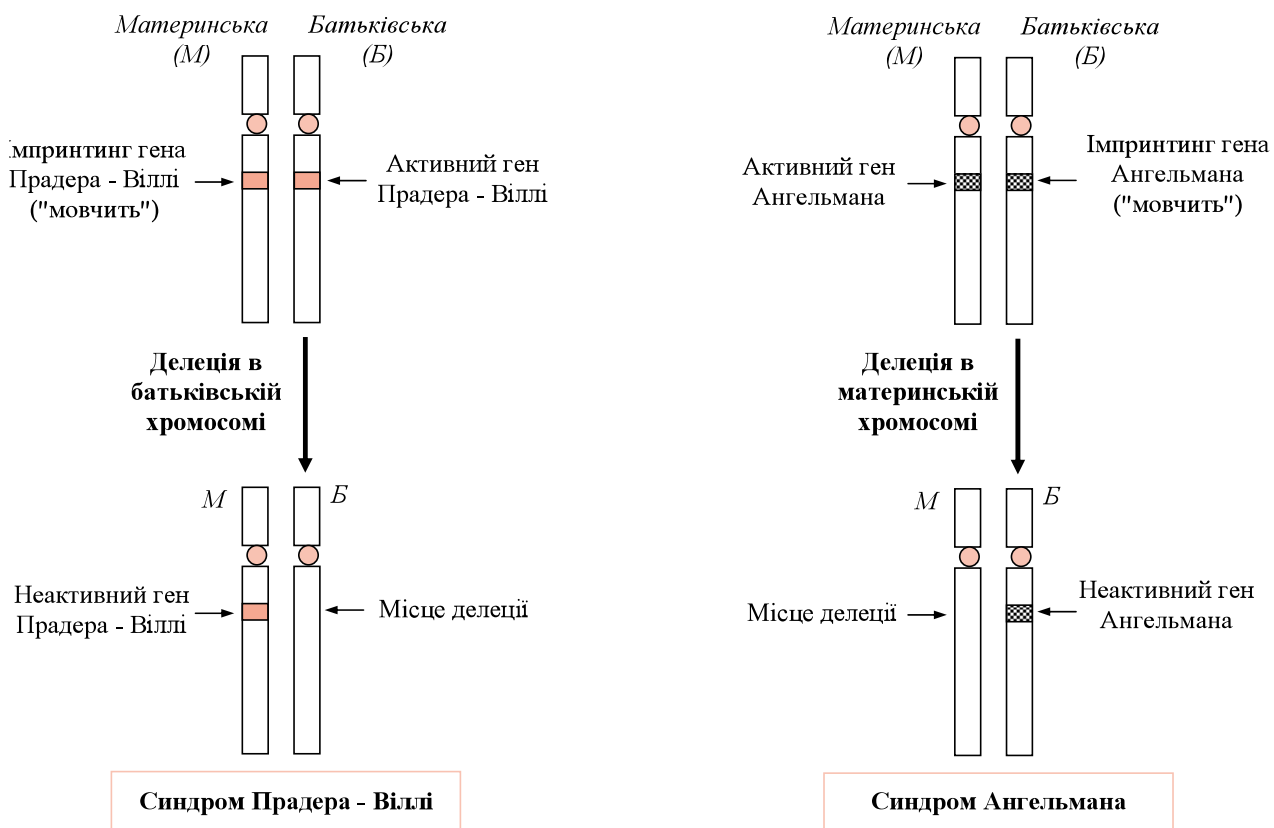
Імпринтинг відбувається в жіночих або чоловічих статевих клітинах до запліднення під час гаметогенезу, а потім він передається всім соматичним клітинам у процесі мітотичного їх поділу.

Явище геномного імпринтингу лежить в основі розвитку деяких спадкових хвороб, зокрема синдрому Прадера – Віллі і синдрому Ангельмана.

*Синдром Прадера – Віллі* характеризується слабоумством, низьким зростом, ожирінням, гіпогонадізмом та іншими клінічними ознаками. У більшості випадків хвороби знаходять делецію середньої ділянки довгого плеча 15-ї хромосоми. Важливим є те, що у всіх хворих ця хромосома має батьківське походження.

*Синдром Ангельмана* є схожим на попередній тільки розвитком слабоумства, але відрізняється від нього іншими ознаками, зокрема, особливою ходою (атаксією), нападами безпричинного сміху та ін. У хворих так само і в тому ж місці знаходять делецію довгого плеча 15-ї хромосоми, але, на відміну від синдрому Прадера - Віллі, ця хромосома має материнське походження.

На рис. 12.12 показано, у який спосіб геномний імпринтинг спричиняється до розвитку цих хвороб. Якщо імпринтинг відбувається на відповідній ділянці материнської 15-ї хромосоми, то її гени «мовчать», зате в нормі працюють алельні гени батьківської хромосоми. Однак, при делеції цієї ділянки зазначені гени зникають, що й призводить до розвитку синдрому Прадера - Віллі. І навпаки, якщо імпринтинг зазнають гени 15-ої хромосоми, але вже батьківського походження, то в нормі тільки материнські гени відповідної ділянки є активними. За умов їхньої делеції виникає синдром Ангельмана.



**Рис. 12.12.** Роль геномного імпринтингу у виникненні спадкових хвороб

#### 4. Хвороби, пов'язані з гонадальним мозаїцизмом.

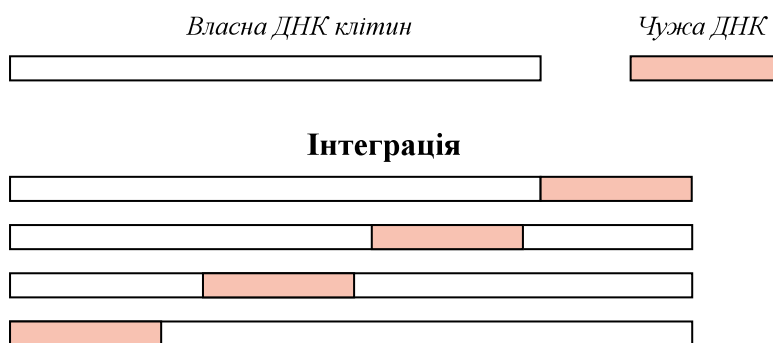
Вище згадувалося, що у дітей від фенотипово здорових батьків інколи розвиваються хвороби з ауто-сомно-домінантним типом передавання. Це пояснювалося тим, що в гаметах одного з батьків можуть виникати нові мутації, які потім будуть передаватися наступним поколінням за законами Менделя. За таких обставин у другому поколінні захворіти на спадкову недугу може тільки одна дитина – саме та, що отримала від батьків гамету з мутантним геном.

Бувають, однак, випадки, коли у фенотипово здорових батьків народжується не одна, а кілька дітей з хворобою, що спадкується за аутосомно-домінантним типом. Пояснення цього лежить у явищі *гонадального мозаїцизму*. Якщо на ранніх етапах ембріогенезу відбудеться мутація в клітинах-попередниках статевих залоз (а не в попередниках соматичних клітин), то в дорослому організмі статеві клітини нестимуть мутантний ген. Після участі таких гамет у заплідненні розвиватимуться організми з усіма ознаками відповідної спадкової хвороби.

## 12.2. ГОМОЛОГІЧНА РЕКОМБІНАЦІЯ І ГЕНЕТИЧНИЙ «НОКАУТ»

Загалом існує два принципи введення чужих генів у геном клітини: (1) інтеграція чужої ДНК з власною ДНК клітини (інфікування) і (2) гомологічна рекомбінація, тобто обмін гомологічними ділянками між екзогенною і ендогенною ДНК.

Перший з них (рис. 12.13) має істотні недоліки, які полягають у тому, що (а) інтеграція екзогенної ДНК з геномом клітин відбувається без будь-якої закономірності, (б) відсутня необхідна точність щодо гена, якого вводять, і місця, у яке він вмонтовується, (в) цей спосіб не можна використовувати для видалення власних генів. Іншими словами, це – маніпулювання з геномом «всліпу».



**Рис. 12.13.** Різні варіанти інтеграції чужої ДНК з ДНК клітини

Зазначених недоліків позбавлений другий спосіб – *гомологічна рекомбінація*. Ідея використання цього явища для отримання генетично модифікованих мишей належить лауреатам Нобелівської премії 2007 року *М. Капеччі* та *О. Смітізу*.

Ще у 80-х роках минулого століття було показано, що гомологічна рекомбінація спонтанно відбувається в культивованих соматичних клітинах ссавців. Ґрунтуючись на цьому, М. Капеччі запропонував стратегію цілеспрямованого впливу на геном клітин ссавців (*gene targeting*) з метою введення чужих і вилучення власних генів. Суть нового підходу полягала саме у використанні гомологічної рекомбінації генів. Цікаво, що заявку вченого на фінансування досліджень було відхилено, оскільки поважні експерти вважали дуже малоімовірним, що введена ззовні ДНК може знайти відповідні нуклеотидні послідовності в геномі клітини-мішені.

Проте, незважаючи на це, М. Капеччі продовжив свої дослідження. Спочатку він показав, що в культурі соматичних клітин частота гомологічної рекомбінації складає 1:1000, тобто вона спонтанно відбувається в одній з тисячі клітин, у які потрапила екзогенна ДНК. Цей показник вважається дуже високим.

Потім науковець здійснив вдалу спробу застосувати гомологічну рекомбінацію для вимкнення («нокауту») HPRT-гена (гена, що кодує гіпоксантин-фосфорибозилтрансферазу, див. вище). Для цього він спочатку штучно отримав дефектний HPRT-ген шляхом введення в його середину гена стійкості до неоміцину (*neo<sup>r</sup>*) – антибіотика, що унеможливорює поділ клітин у культурі (рис. 12.14). Такий дефектний ген, з одного боку, вже не міг бути матрицею для синтезу HPRT, а з другого – забезпечував стійкість клітин – його носіїв – до антибіотика, що легко можна було виявити при культивуванні

клітин у спеціальному НАТ-середовищі і при доданні до нього неоміцину. Після внесення в культуру клітин дефектного гена в ній з'являлися резистентні до неоміцину клітини, що втрачали здатність розмножуватися в НАТ-середовищі. Це свідчило про те, що відбулася гомологічна рекомбінація, тобто заміна нормального HPRT-гена на введений ззовні дефектний ген (рис. 12.15).

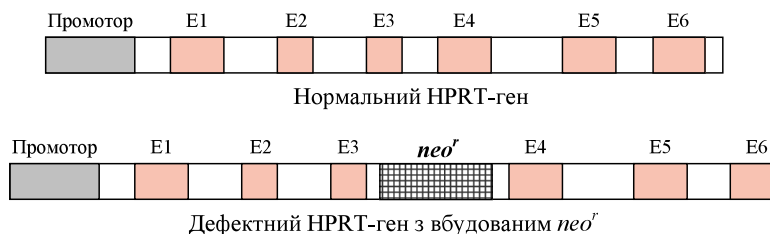


Рис. 12.14. Отримання штучних дефектних генів

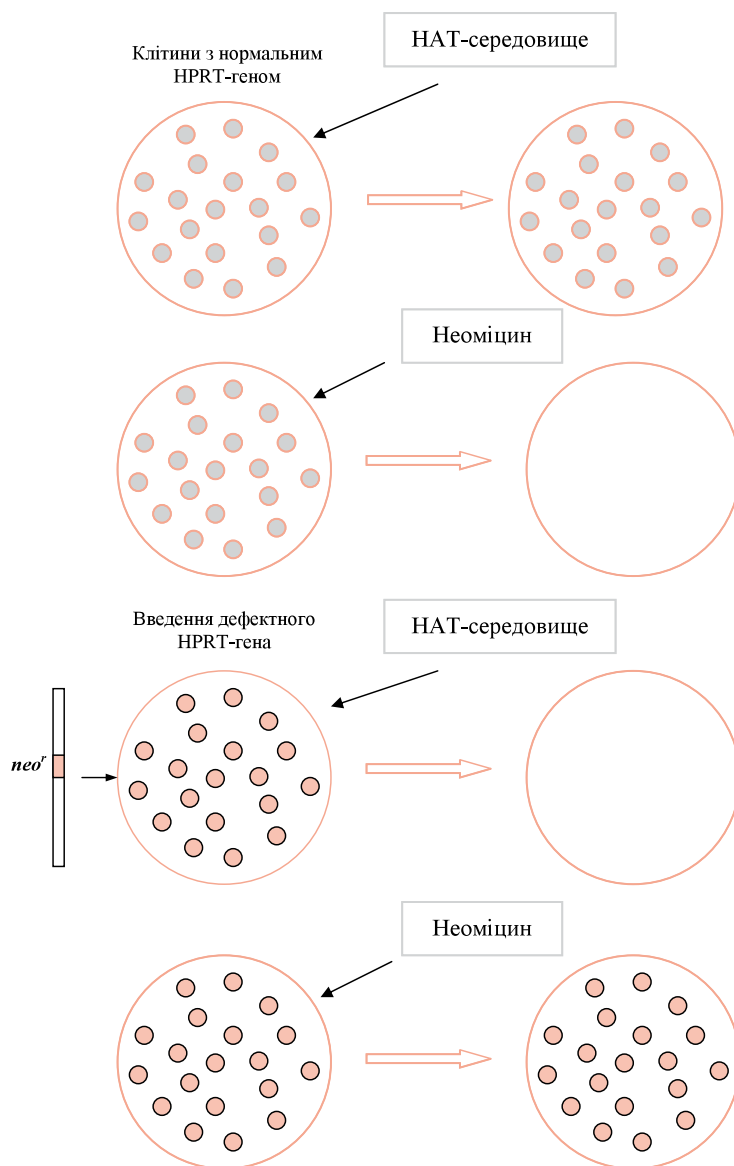


Рис. 12.15. Заміна нормальних генів на дефектні шляхом гомологічної рекомбінації

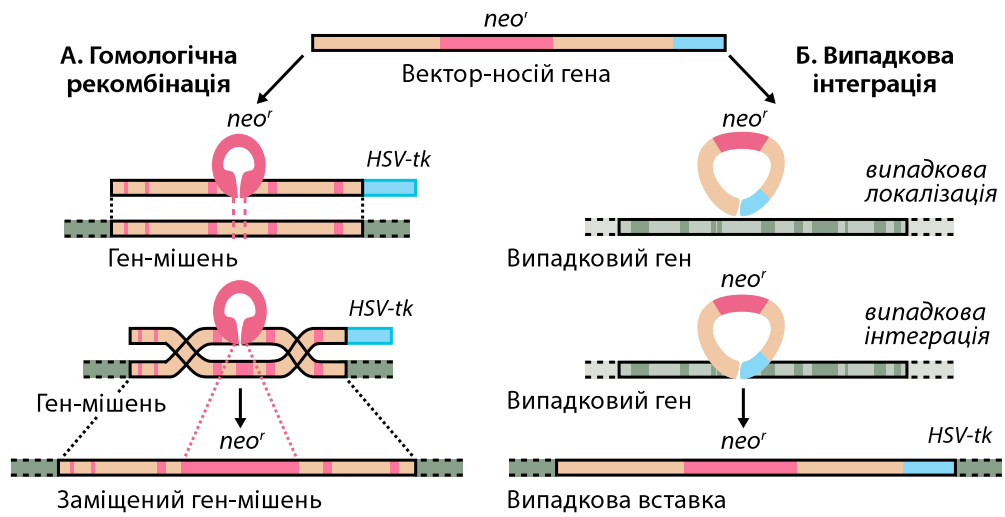


Рис. 12.16. Варіанти взаємодії введеного ззовні гена з ДНК клітини

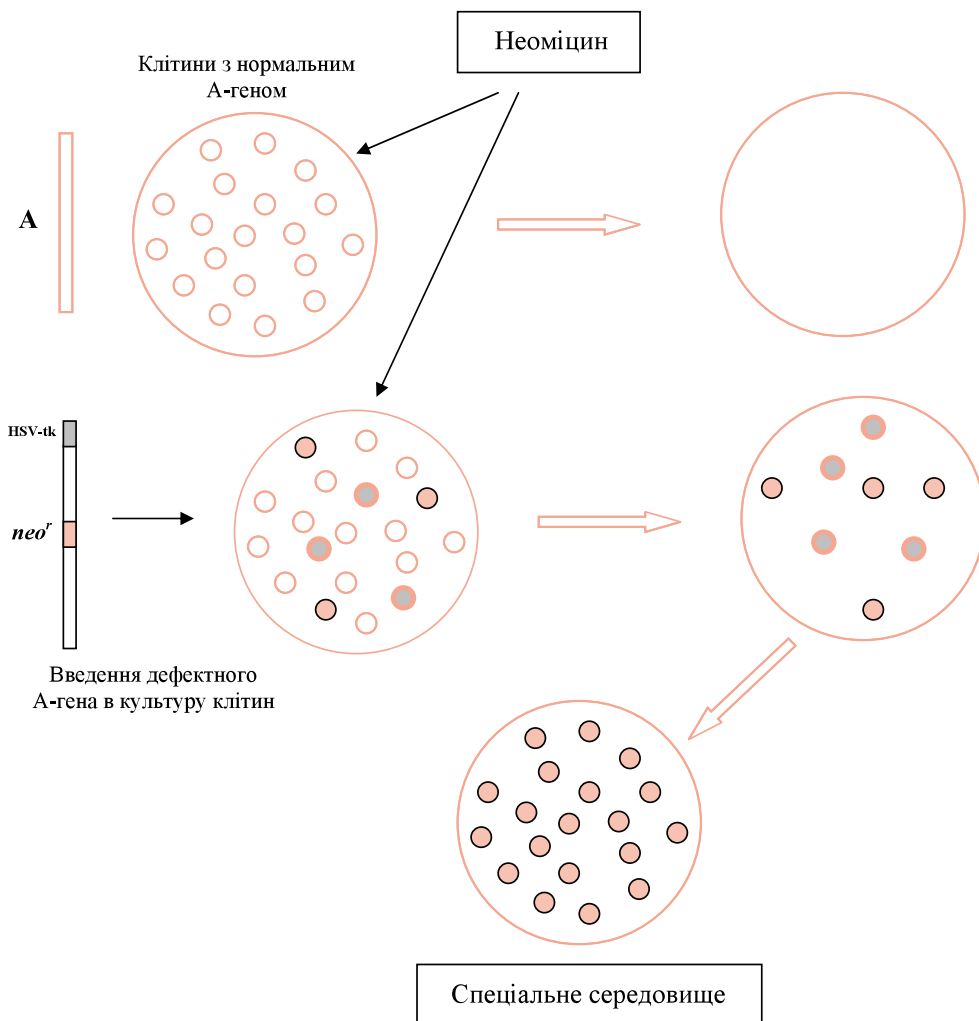


Рис. 12.17. Метод позитивно-негативної селекції культивованих ембріональних стовбурових клітин

Далі постало питання, чи можна в такий спосіб замінювати гени, діяльність яких не вдається виявити в культурі клітин. М. Капеччі запропонував стратегію *позитивно-негативної селекції* ембріональних стовбурових клітин (ЕСК, див. вище).

Якщо до будь-якого штучно створеного дефектного гена (містить всередині себе *neo<sup>r</sup>*) приєднати ще один, наприклад, HSV-tk (герпесвірусної тимідинкінази), і ввести в культуру ЕСК, то можливими є два варіанти: (1) інтегрування введеного гена з ДНК клітин і (2) гомологічна рекомбінація (рис. 12.16). У першому випадку клітини отримують як дефектний ген, так і HSV-tk, у другому – тільки дефектний ген. Далі треба тільки розділити ці два типи клітин і отримати чисту популяцію ЕСК, у яких відбувся “нокаут”, тобто заміна нормального гена на дефектний нефункціонуючий (рис. 12.17).

Отримані в такий спосіб ЕСК використовують для виведення чистих ліній генетично модифікованих мишей (див. вище).

### 12.3. ЛАУРЕАТИ НОБЕЛІВСЬКИХ ПРЕМІЙ

У поданій нижче таблиці наведено лауреатів Нобелівської премії, що відзначилися видатними досягненнями у галузі генетичних досліджень.

Рік	Лауреати премії	За що присуджено премію
1910	Альбрехт Коссель	За внесок у вивчення хімії клітин, зроблений дослідженнями білків і нуклеїнових речовин
1933	Томас Хант Морган	За відкриття, пов'язані з роллю хромосом
1946	Герман Джозеф Мьоллер	За відкриття появи мутацій під впливом рентгенівського випромінювання
1958	Джордж Бідл, Едуард Тейтем	За відкриття, що стосуються ролі генів у специфічних біохімічних процесах
1958	Джошуа Ледерберг	За відкриття, що стосуються генетичної рекомбінації і організації генетичного матеріалу в бактерій
2007	Маріо Капеччі, Мартін Еванс, Олівер Смітз	За відкриття принципів введення специфічних генних модифікацій в мишей з використанням ембріональних стовбурових клітин