

УДК 575.2:616.056.7

ЭКСПАНСИЯ ТРИНУКЛЕОТИДНЫХ ПОВТОРОВ

© 2001 г. **Е. Ю. Сянова**, С. М. Миркин*

Department of Molecular Genetics, University of Illinois at Chicago, IL 60607, USA

Поступила в редакцию 02.10.2000 г.

В обзоре рассмотрен новый источник нестабильности генома – экспансия тринуклеотидных повторов. Это явление, открытое в 1991 г. при клонировании гена, отвечающего за развитие синдрома ломкой X-хромосомы, оказалось ответственным за патогенез большого числа нейродегенеративных заболеваний человека. Помимо очевидного медицинского значения, открытие экспансии тринуклеотидных повторов раскрыло природу одной из фундаментальных проблем генетики человека – неменделевского типа наследования, названного антиципацией. Понимание механизмов экспансии повторов и молекулярных путей, связывающих экспансию повторов с заболеваниями человека, стало важной задачей и одним из выдающихся достижений современной биологии. В настоящей работе обсуждаются достижения в этой области за последнее десятилетие. Основное внимание уделено разработке молекулярных моделей экспансии повторов.

Ключевые слова: тринуклеотидные повторы, экспансия, репликация, рекомбинация, экспрессия гена, нестабильность генома, полиморфизм, неменделевское наследование, генетическая антиципация.

СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ

Расширяющийся мир тринуклеотидных повторов был открыт в результате изучения наследственного заболевания человека, названного синдромом ломкой X-хромосомы. Это заболевание является наиболее часто встречающейся формой задержки психического развития и наблюдается с частотой примерно 1 : 5000 [1]. Клинические симптомы этого заболевания, обычно проявляющиеся в подростковом возрасте, включают проблемы обучения, низкий коэффициент интеллекта, макроорхидизм и характерное удлиненное лицо с оттопыренными ушами [2]. Свое название синдром получил по выявленной цитогенетическими методами специфической перетяжке в участке Xq27.3 из фракции метафазных лимфоцитов больных [3]. Ломкость хромосомы чувствительна к содержанию фолата, т.е. индуцируется в клетках, культивируемых в среде с недостатком фолиевой кислоты, тимидина или в присутствии метотрексата – ингибитора дигидрофолатредуктазы [3]. Ломкость X-хромосомы, а также передача заболевания по материнской линии [4] указывали на то, что синдром вызывается мутацией в этой хромосоме. В то же время, характер наследования заболевания оказался необычным: вероятность развития, время появления симптомов и тяжесть заболевания возрастали в ряду поколений [5, 6]. Этот феномен, названный генетической антиципацией (усиление наследственных проявлений), не мог быть объяснен в рамках менделев-

ского наследования и указывал на динамическую природу мутации, вызывающей синдром ломкой X-хромосомы. Проблема была решена в 1991 г. с помощью позиционного картирования ломкого сайта X-хромосомы [7, 8]. Оказалось, что в большинстве случаев заболевание связано с экспансией повтора (CGG)_n в 5'-нетранслируемой области (5'-UTR) гена, названного *FMR1*. У здоровых людей ген *FMR1* содержит 5–50 таких повторов, стабильно передающихся из поколения в поколение. У носителей премутации число копий повторов несколько выше (50–200), и хотя клинически это не проявляется, удлиненная версия повтора может передаваться потомству. В следующих поколениях частота экспансии повтора возрастает, так что вероятность расширения повтора в каждом последующем поколении выше, чем в предыдущем. В результате, число повторов (CGG) в гене *FMR1* у больных синдромом ломкой X-хромосомы превышает 200 и часто достигает нескольких тысяч. Таким образом, тяжесть симптомов наследственного заболевания зависит от длины повтора (CGG)_n.

Антиципация характерна не только для синдрома ломкой X-хромосомы. В действительности, впервые это явление было отмечено еще в 1918 г. у больных другим нейродегенеративным заболеванием – миотонической дистрофией [9], а в дальнейшем и при спинобульбарной мышечной атрофии [10], болезни Гентингтона [11], атаксии Фридрейха [12] и др. Более того, предполагается, что антиципация в большей или меньшей степени характерна для наследования таких сложных меди-

*Эл. почта: mirkin@uic.edu

ко-генетических нарушений, как шизофрения [13, 14] или аутизм [15].

Сейчас становится понятно, что в подавляющем большинстве случаев усиление наследственных проявлений указанных заболеваний обусловлено экспансией простых повторов. В таблице приведены примеры таких заболеваний и их важнейшие генетические характеристики. Хорошо видно, что во всех случаях заболевания связаны с экспансией простых повторов, когда их длина становится больше 60–150 п.н. В большинстве случаев эти повторы представляют собой простые тринуклеотидные блоки. К настоящему моменту известны три типа тринуклеотидных повторов, способных к экспансии: $(CGG)_n \cdot (CCG)_n$, $(CTG)_n \cdot (CAG)_n$ и $(GAA)_n \cdot (TTC)_n$. Минимальная длина, необходимая для экспансии указанных последовательностей, – 20–50 повторов. Однако очевидно, что феномен экспансии не ограничен тринуклеотидными повторами. Так, описан случай прогрессирующей миоклонической эпилепсии первого типа, связанной с экспансией GC-богатого додекамерного повтора в промоторном участке гена цистатина В [16].

Генетические основы патогенеза перечисленных в таблице заболеваний имеют мало общего, за исключением экспансии повторов. Гены, содержащие удлиняющиеся повторы, могут находиться как в половых хромосомах, так и в аутосомах, возможен и доминантный, и рецессивный тип наследования, передача по материнской, отцовской линии или несвязанная с полом. Гены-мишени не имеют выраженного функционального сходства. Повторы располагаются в различных участках этих генов, и результатом экспансии повторов может быть как утрата, так и приобретение геном новой функции.

Изучение болезней, связанных с экспансией тринуклеотидных повторов, сконцентрировано на трех основных вопросах: (1) как удлиняющиеся тринуклеотидные повторы влияют на экспрессию генов; (2) каковы молекулярные основы патогенеза нейродегенеративных заболеваний, связанных с экспансией повторов; (3) каковы механизмы экспансии повторов. *A priori* очевидно, что ответы на эти вопросы будут различными для разных повторов. Например, вызванное экспансией повтора нарушение функции гена-носителя признака может проявиться на уровне транскрипции, процессинга РНК, трансляции и пост-трансляционно. В настоящем обзоре рассмотрены, главным образом, механизмы экспансии повторов. Влияние тринуклеотидных повторов на экспрессию генов и последующие события, приводящие к заболеванию, рассмотрены кратко и на наиболее хорошо изученных примерах.

ОТ ЭКСПАНСИИ ПОВТОРОВ К БОЛЕЗНИ

Синдром ломкой X-хромосомы

Механизм инактивации гена *FMR1*, связанной с экспансией повтора $(CGG)_n$, изучен достаточно хорошо [17]. Нормальные аллели гена *FMR1* и премутантные аллели увеличенного размера эффективно экспрессируются и дают белковый продукт FMRP. Интересно, что при промежуточном уровне экспансии повторов *CGG* количество мРНК *FMR1* возрастает, но эффективность ее трансляции низка, поэтому содержание белка FMRP остается на обычном уровне (Г. Раса и Е. Сиянова, не опубликовано). В полноразмерных мутантных аллелях ($n > 200$) весь промоторный участок гена *FMR1*, содержащий повтор $(CGG)_n$ и другие элементы, гиперметилирован и транскрипционно не активен. Действительно, метилирование, индуцированное экспансией повтора, распространяется на значительное расстояние от повтора и приводит к гетерохроматинизации более 1 млн.п.н. прилежащей ДНК [18, 19]. Кроме того, гиперметилирование вызывает очень позднюю репликацию всего участка *FRAXA*, что в значительной степени обуславливает ломкость.

Синдром ломкой X-хромосомы явно связан с отсутствием белка FMRP. Это предположение подтверждается тем, что у больного с клинически тяжелой формой заболевания выявлена точечная мутация в функционально важном домене FMRP [20]. Эволюционно высококонсервативный РНК-связывающий белок FMRP эффективно синтезируется в нейронах и половых железах [21]. Он локализуется преимущественно в цитоплазме и ассоциирован с активными рибосомами [22]. Белок FMRP состоит из двух РНК-связывающих доменов, КН и RGG, и содержит сигналы ядерной локализации и ядерного экспорта [23]. В соответствии с так называемой челночной моделью [24] белок FMRP переносится из цитоплазмы в ядро, где участвует в образовании мРНК-частиц. Затем эти частицы выводятся из ядра с помощью активного процесса, управляемого экспортином 1. В цитоплазме мРНК-частицы поступают к полирибосомам. Транспортный процесс с участием FMRP важен для любой клетки, но особое значение он имеет для нейронов, где мРНК переносится вдоль дендрита к полисомам, расположенным около синапсов [24]. Отсутствие способности к обучению ориентации в пространстве и задержка созревания синапсов у мышей с нокаутированным геном *FMR1* [25] подтверждают правильность этой гипотезы.

Полиглутаминовые заболевания

С экспансией CAG-повторов, расположенных в кодирующих участках различных генов человека, связано развитие восьми нейродегенератив-

Заболевания человека, связанные с экспансией простых повторов ДНК

Заболевание	Характер наследования	Линия наследования	Ген	Положение на хромосоме	Белок	Число повторов		Положение повтора	Тип мутации
						норма	мутация		
Синдром ломкой X-хромосомы	X-сцепленный доминантный	Материнская	<i>FMR1</i>	Xq27.3	FMRP	(CGG) < 50	(CGG) > 200	5'-UTR	Утрата функции
Задержка умственного развития из-за ломкости XE	X-сцепленный	Не выражена	<i>FMR2</i>	Xq28	Белок FMR2	(CCG) < 35	(CCG) > 200	5'-UTR	»
Миотоническая дистрофия	Аутосомный доминантный	Материнская	<i>DMPK</i>	19q13	Протеинкиназа MD	(CTG) < 35	(CTG) > 50	3'-UTR	Приобретение функции
Спиналомозжечковая атаксия типа 8	Аутосомный доминантный	»	<i>SCA8</i>	13q21	Нет	(CTG) < 40	(CTG) > 110	Антисмысловая РНК	»
Атаксия Фридрейха	Аутосомный рецессивный	»	<i>X25</i>	9q13–21.1	Фратаксин	(GAA) < 35	(GAA) > 100	Интрон 1	Утрата функции
Спинобульбарная мышечная атрофия	X-сцепленный рецессивный	Не выражена	<i>AR</i>	Xq13–21	Рецептор андрогенов	(CAG) < 30	(CAG) > 40	Кодирующая область	Приобретение функции
Болезнь Гентингтона	Аутосомный доминантный	Отцовская	<i>IT15</i>	4p16.3	Гентингтин	(CAG) < 40	(CAG) > 40	»	»
Дентаторубраллидо-луизийская атрофия	»	»	<i>DRPLA</i>	12p13.31	Атрофин-1	(CAG) < 35	(CAG) > 50	»	»
Спиналомозжечковая атаксия типа 1	»	»	<i>SCA1</i>	6p23	Атаксин-1	(CAG) < 40	(CAG) > 40	»	»
Спиналомозжечковая атаксия типа 2	»	»	<i>SCA2</i>	12q24.1	Атаксин-2	(CAG) < 30	(CAG) > 35	»	»
Спиналомозжечковая атаксия типа 3	»	»	<i>SCA3</i>	14q32.1	Атаксин-3	(CAG) < 40	(CAG) > 40	»	»
Спиналомозжечковая атаксия типа 7	»	»	<i>SCA7</i>	3p12–13	Атаксин-7	(CAG) < 20	(CAG) > 40	»	»
Спиналомозжечковая атаксия типа 6	»	Не выражена	<i>CACNA1A</i>	19p13	Субъединица $\alpha 1A$ потенциал-зависимого Са-канала	(CAG) < 20	(CAG) > 20	»	Не установлено
Прогрессирующая миоклоническая эпилепсия типа 1	Аутосомный рецессивный	Не выражена	<i>CSTB</i>	21q22.3	Цистатин	(C ₄ GC ₄ GCG) < 3	(C ₄ GC ₄ GCG) > 60	Промотор	Утрата функции

ных заболеваний, в том числе болезни Гентингтона [26], спинобульбарной мышечной атрофии (SBMA) [27], некоторых форм спинально-мозжечковой атрофии [28, 29] и денторубропаллидолизийской атрофии [30]. Во всех этих случаях экспансия CAG-повторов не влияет на транскрипцию генов-мишеней или трансляцию соответствующих мРНК, но кодируемые повтором полиглутаминовые участки вызывают самоагрегацию белковых продуктов этих генов и их агрегацию с другими белками [31, 32]. Последнее может быть обусловлено двумя механизмами. Согласно первому предполагается, что фермент транслугаминаза сшивает полиглутаминовые участки с полипептидами, содержащими лизильные группы [33, 34]. В результате образуются агрегаты, состоящие из полиглутаминовых кополимеров. Вторая гипотеза полагает, что две антипараллельных β -цепи полиглутаминовых повторов могут сцепляться с помощью водородных связей [35]. Эта так называемая “полярная застёжка” может вызывать мультимеризацию и агрегирование. В любом случае, независимо от конкретного механизма полиглутамин-содержащие белки образуют агрегаты во всех изученных системах, в том числе в культурах клеток [36–39], простых модельных организмах [40–42], у трансгенных мышей [38, 43–45] и в нейронах больных людей [46].

Агрегация полиглутамин-содержащих белков является, очевидно, причиной перечисленных нейродегенеративных заболеваний, за исключением SBMA. Во-первых, формирование агрегатов легко объясняет токсичность “приобретения функции”, вызываемого экспансией полиглутаминовых повторов, которое определяет их доминантное наследование. Во-вторых, существует выраженная корреляция между образованием агрегатов в определенных группах нейронов и их подверженностью прогрессирующей дисфункции и разрушению как проявлениям определенной болезни [46]. Наконец, сверхэкспрессия только полиглутаминовых участков токсична как для нейронов, так и для периферических клеток, что показано на культурах клеток [36–38] и на животных системах [38, 40–42, 44–45]. Исключение представляет только SBMA – рецессивное заболевание, связанное с экспансией полиглутаминового повтора в рецепторе андрогенов (AR) [27], которая не влияет на агрегацию белка, но приводит к частичной утрате функции рецептора [47].

Атаксия Фридрейха

Атаксия Фридрейха – наиболее часто встречающаяся форма наследственных атаксий – вызывается экспансией повтора GAA в первом интроне гена фратаксина [48]. Экспансия $(GAA)_n$ подавляет на уровне транскрипции экспрессию гена фратаксина, причем степень подавления пропор-

циональна размеру повтора [49]. Встраивание повторов $(GAA)_n \cdot (TTC)_n$ возрастающей длины в обеих ориентациях в интрон репортерного гена приводило к подавлению транскрипции этого гена в опытах по временной трансфекции [50] и в ядерных экстрактах [51]. Наиболее сильное ингибирование наблюдали, когда повтор GAA находился в кодирующей цепи, как в случае гена фратаксина. Было высказано предположение, что подавление элонгации транскрипции может быть связано с формированием Н-ДНК (см. ниже) этим гомопуриногомопиридиновым повтором [50]. Возможность образования Н-ДНК при транскрипции повторов $(GAA)_n \cdot (TTC)_n$ подтверждают опыты *in vitro* с использованием РНК-полимеразы фага Т7 [52].

Инактивация гена фратаксина приводит, очевидно, к развитию атаксии Фридрейха. Это подтверждается тем, что у 2% больных в гене фратаксина выявлены миссенс- и нонсенс-мутации, или мутации, нарушающие сплайсинг, а не экспансия GAA-повторов [53]. Интересно, что во всех известных случаях больные были гетерозиготны по мутантному аллелю фратаксина, что указывает на летальность гомозиготных мутаций.

Фратаксин является, по всей видимости, митохондриальным белком [49, 54], не имеющим структурного сходства с белками, функции которых известны. При этом фратаксин высококонсервативен у всех эукариот – от дрожжей до человека [48]. Инактивация дрожжевого гомолога фратаксина вызывает накопление железа в митохондриях [55] и гиперчувствительность к окислительному стрессу [56]. Можно предположить, что избыток митохондриального железа, взаимодействуя с кислородом, приводит к окислению жизненно важных компонентов клетки, утрате митохондриальной ДНК и, в результате, к необратимому разрушению клетки. Было бы интересно рассмотреть предположение о связи нарушения обмена железа с патогенезом атаксии Фридрейха, однако имеющихся данных пока недостаточно. Отложения железа найдены в клетках миокарда [57] и зубчатого ядра головного мозга [58] больных атаксий Фридрейха. Кроме того, в ткани сердца таких больных выявлены нарушения дыхательной цепи, однако потерь митохондриальной ДНК у них никогда не наблюдали. Для проверки этой очень привлекательной гипотезы, связывающей обмен железа и нейродегенеративные заболевания, требуются дальнейшие исследования.

Миотоническая дистрофия

Миотоническая дистрофия – наиболее распространенная форма мышечной дистрофии человека – вызывается экспансией CTG-повтора, расположенного в 3'-UTR гена, кодирующего так назы-

ваемую протеинкиназу миотонической дистрофии (DMPK) [61, 62]. Несмотря на название, роль этого гена в развитии миодистрофии далеко не ясна. В настоящее время существуют три гипотезы, объясняющие молекулярный механизм патогенеза этого заболевания. Первая гипотеза утверждает, что экспансия CTG-повтора в 3'-UTR гена DMPK блокирует процессинг его первичного транскрипта, что приводит к отсутствию киназы и возникновению болезни. Эта гипотеза поддерживается данными о задержке РНК DMPK, содержащей повтор, в ядрах [62]. Однако результаты, полученные в опытах по инактивации гена DMPK у мышей, в значительной степени противоречат этой гипотезе: мыши с одним инактивированным аллелем DMPK не имели мышечной патологии, в то время как инактивация обоих аллелей приводила к легкой миопатии и нарушению сердечного ритма в позднем возрасте [63, 64].

Согласно второй гипотезе экспансия CTG-повторов изменяет структуру хроматина, окружающего повтор, что вызывает подавление активности расположенного ниже по ходу транскрипции гена *SIX5/DMAHP* [65, 66]. Этот ген кодирует гомеобелок, участвующий в регуляции дифференцировки мышечных клеток. У мышей с гомозиготным и гетерозиготным нокаутом гена *SIX5* часто развиваются катаракты – один из характерных признаков мышечной дистрофии [67, 68]. Следует, однако, отметить, что основные проявления заболевания – миотония и миопатия – никогда не наблюдаются при нокауте гена *SIX5*.

Третья гипотеза, представляющаяся наиболее убедительной, утверждает, что удлиненные CUG-повторы в РНК DMPK взаимодействуют с определенными CUG-связывающими белками, что приводит к нарушению процессинга или трансляции РНК, специфичных для мышечной ткани [69]. Это могло бы привести к приобретению РНК DMPK токсичной функции, объясняющей доминантное наследование. В настоящее время известно несколько белков, способных связывать CUG-повторы в РНК. Один из таких белков – CUGBP1 [70], играет важную роль в функционировании РНК, содержащих в регуляторных участках CUG-повторы. Показано, что этот белок влияет на сплайсинг ряда мышечноспецифичных РНК, в частности мРНК сердечного тропонина Т и самого белка DMPK [71]. Он влияет также на трансляцию мРНК *С/ЕВРβ* [72], фактора транскрипции, участвующего в мышечной дифференцировке. Еще один из CUG-связывающих белков – киназа, активируемая двухцепочечной РНК (PKR), которая связывается с удлиненными CUG-повторами благодаря их способности формировать устойчивые шпильки [73]. Таким образом, согласно третьей гипотезе, любая мышечноспецифичная РНК с удлиненными CUG-повторами может быть причиной миотонической дистрофии. Недавно

получены данные в пользу этого предположения: у трансгенных мышечей, содержащих 250 CUG-повторов в 3'-UTR гена актина скелетных мышц, наблюдали как миопатию, так и миотонию, характерные для миотонической дистрофии [74].

Пример миотонической дистрофии ясно показывает, что экспансия CUG-повторов может влиять на различные стороны функционирования гена, транскрипцию, ядерный транспорт и сплайсинг. По-видимому, возможны и другие последствия действия CUG-повторов на экспрессию генов. Например, недавно мы показали, что CUG-повторы умеренной длины находящиеся в 5'-UTR репортерного гена, снижают уровень его экспрессии, блокируя сканирование матрицы при трансляции [75]. Вполне вероятно, что и другие удлиненные тринуклеотидные повторы могут влиять на различные стадии экспрессии генов. Поэтому поиск генов, в регуляторной области которых содержатся потенциально удлиняемые повторы, может привести к выявлению новых генетических заболеваний человека.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЭКСПАНСИИ ТРИНУКЛЕОТИДНЫХ ПОВТОРОВ

Как видно из приведенных выше данных, влияние удлиняемых повторов на экспрессию генов, носителей этих повторов, может быть самым разнообразным, и следовательно, молекулярные механизмы патогенеза различных заболеваний будут совершенно разными. Однако считается, что существует единый механизм экспансии различных повторов. Это предположение основано на двух чертах, характерных для всех случаев экспансии: единой пороговой длине – примерно 30 повторов, и одномоментном появлении большого числа дополнительных копий повтора [76]. Тем не менее, в настоящее время механизм(ы) экспансии повторов точно не установлен(ы). Ниже рассмотрены наиболее интересные и активно разрабатываемые гипотезы.

Зависимость экспансии повторов от их длины указывает на возможное участие в этом процессе необычной вторичной структуры ДНК этих повторов. Подобное предположение вытекает из результатов изучения необычных структур в сверхспирализованной ДНК, в которой вероятность приобретения данным повтором необычной конформации экспоненциально зависит от его длины [77]. Действительно, экспериментальные данные указывают на необычные структурные возможности тринуклеотидных повторов. Химическим зондированием показано, что даже в двухцепочечной линейной ДНК реактивность удлиненных повторов $d(CNG)_n$ отличается от реактивности канонической В-ДНК [78]. Анализ отдельных цепей ДНК, содержащих различные

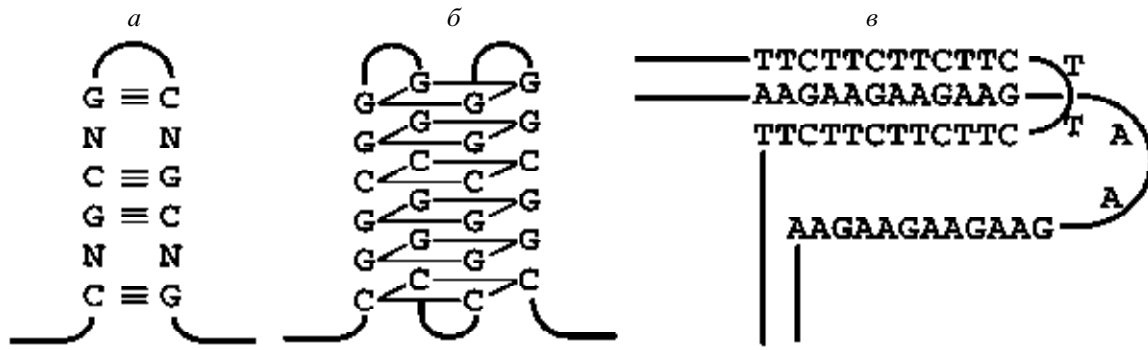


Рис. 1. Необычные структуры ДНК, образуемые тринуклеотидными повторами: шпилька (а), квадруплекс (б), Н-ДНК (в).

тринуклеотидные повторы, с использованием различных методов, в том числе термоденатурации и определения подвижности в геле, показало, что они способны сворачиваться в компактные структуры [79–82]. Прямое доказательство сворачивания удлиняемых повторов $d(CGG)_n$, $d(CGG)_n$, $d(CTG)_n$, $d(CAG)_n$ в несовершенные шпильки, стабилизируемые как уотсон-криковскими, так и неканоническими парами нуклеотидов (рис. 1а), получено с помощью ЯМР-анализа [83–85]. Формирование шпилек менее характерно для повторов, неспособных к экспансии. Поэтому предполагается, что в этих случаях пороговая длина для экспансии соответствует энергии, необходимой для формирования шпильки [84]. Отметим, что шпильки, образуемые четырьмя перечисленными выше повторами, различаются природой некоплементарных пар, а стабильность этих шпилек варьирует вследствие различного вклада разных неправильных пар и меняется в ряду $CGC > CCG \approx CTG > CAG$ [84].

Тринуклеотидные повторы могут приобретать и другие необычные конформации ДНК. Одноцепочечные $(CGG)_n$ повторы сворачиваются в устойчивую четырехспиральную структуру, стабилизируемую зацеплением квартетов $G^*C^*G^*G$ и $C^*C^*C^*C$ (рис. 1б) [86]. Под влиянием отрицательной сверхспирализации повторы $(GAA)_n \cdot (TTC)_n$ могут приобретать конформацию трехспиральной Н-ДНК (рис. 1в) [87, 88]. Следует отметить, что две группы исследователей по разному трактуют экспериментальные данные о тонкой структуре такой тройной спирали: в одном случае это Н-у-структура (пиримидин-пуринопиримидиновый триплекс) [87], в другом – Н-г-структура (пиримидин-пуринопуриновый триплекс) [88].

Формирование тринуклеотидными повторами необычных структур может затруднять различные процессы в ДНК, приводящие к экспансии повторов. Например, давно известно, что ДНК-полимеразы могут замедляться или останавливаться на стабильных шпильках [89–94], триплексах [95–

98] и G-квартетах. В то же время считается, что необычные структуры ДНК увеличивают эффективность генетической рекомбинации [102–106]. Однако непонятно, каким образом изменения в функциональных состояниях ДНК приводят к экспансии повторов.

Это подводит нас ко второй общей черте экспансии повторов – ее крупномасштабному характеру. Давно известно, что простые тандемные повторы любого нуклеотидного состава характеризуются полиморфизмом длины. Эти различия длины незначительны, обычно 1–2 элементарные повторяющиеся единицы. Обычно это явление объясняют проскальзыванием цепей при репликации ДНК, содержащей множественные повторы [107]. Напротив, в случае тринуклеотидных повторов на одной стадии добавляются десятки или даже сотни повторяющихся единиц, что исключает механизм случайного проскальзывания. Значительное увеличение длины повторяющейся последовательности может быть объяснено *a priori* двумя причинами: неточностью при репликации повторов или неравным кроссинговером сходных повторяющихся последовательностей, расположенных на гомологичных хромосомах или сестринских хроматидах.

Большинство данных указывает на репликативный механизм экспансии. Установлено, что полимеризация ДНК *in vitro* на матрицах с различными тринуклеотидными повторами происходит аномально. Про- и эукариотические ДНК-полимеразы останавливаются на специфических участках двухцепочечных ДНК-матриц с повторами $(CTG)_n \cdot (CAG)_n$ и $(CGG)_n \cdot (CCG)_n$, и скорость термации возрастает с увеличением длины повтора [108]. На одноцепочечных матрицах блоки $(CGG)_n$ вызывают K^+ -зависимую остановку полимеризации, обусловленную, предположительно, формированием квадруплекса [109]. Повторы $(GAA)_n \cdot (TTC)_n$ как в двух-, так и в одноцепочечных ДНК-матрицах являются наиболее серьезным препятствием для ДНК-полимераз, поскольку

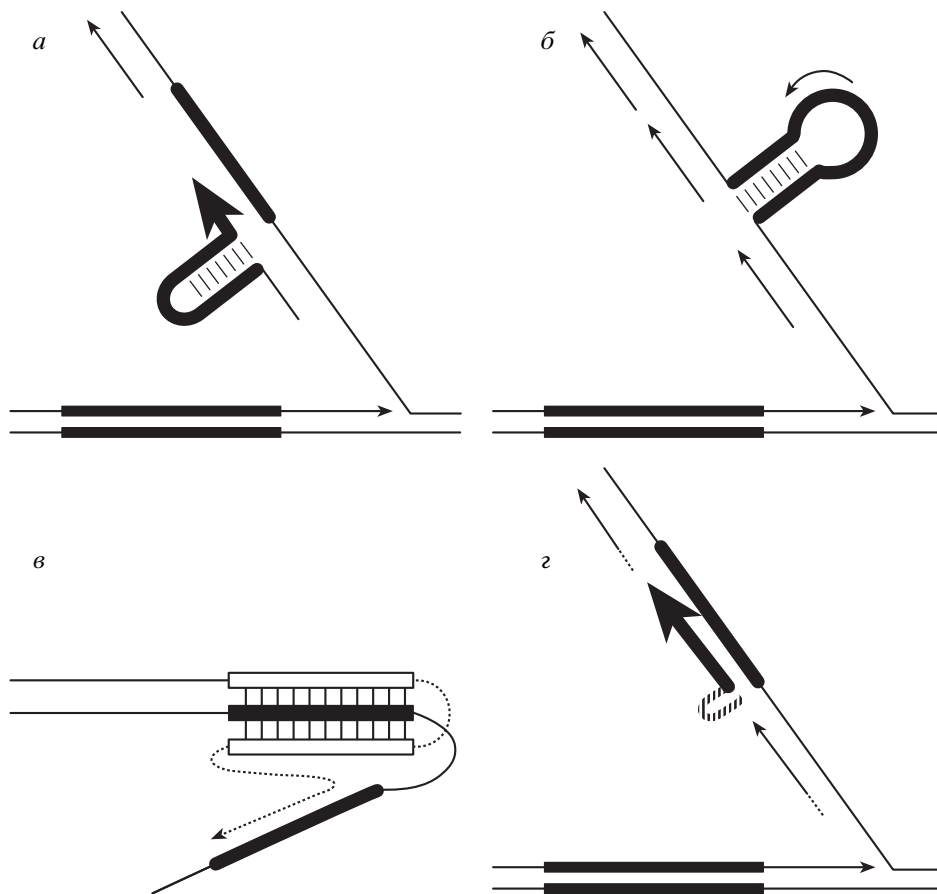


Рис. 2. Предполагаемые механизмы экспансии тринуклеотидных повторов при репликации ДНК. *а* – Экспансия, связанная с образованием шпильки при синтезе отстающей цепи ДНК. *б* – Экспансия, обусловленная инициацией дополнительного фрагмента Оказаки в петле шпильки матрицы отстающей цепи. *в* – Экспансия с формированием триплекса при синтезе ДНК на отстающей цепи. *г* – Экспансия при смещении праймера для фрагмента Оказаки с последующим образованием шпильки. Повторяющиеся участки показаны черными прямоугольниками, направление синтеза ДНК указано стрелкой, праймеры фрагментов Оказаки выделены штриховыми линиями.

ку при полимеризации формируют Н-ДНК [87]. Таким образом, предполагается, что необычные структуры ДНК в области тринуклеотидных повторов могут быть причиной остановки полимеризации ДНК. Подобная остановка, в свою очередь, способствует неправильному спариванию новосинтезированной и матричной цепей ДНК [110]. Возобновление полимеризации может привести к увеличению или к уменьшению длины повтора, в зависимости от того, какая из цепей ДНК (матричная или новосинтезированная соответственно) образовала вторичную структуру (рис. 2*а*). На рис. 2 представлены две альтернативные модели, показывающие, что причиной экспансии может быть синтез дополнительного фрагмента Оказаки, иницируемого в петле шпильки, образованной повтором (рис. 2*б*) [76], или же формирование структуры, подобной Н-ДНК, при сворачивании новосинтезированного повтора $(CTG)_n$ · $(CAG)_n$ (рис. 2*в*) [87].

Все рассмотренные модели основаны на предположении, что экспансия повторов происходит при синтезе отстающей цепи ДНК. Это предположение подтверждается данными по сохранению тринуклеотидных повторов в модельных бактериальных и дрожжевых системах. Установлено, что стабильность различных повторов сильно зависит от их длины и ориентации относительно начала репликации (*ori*) [111–113]. Длинные повторы $(CTG)_n$ или $(CGG)_n$ эффективно делетировались из отстающей цепи, но обладали склонностью к удлинению на ведущей цепи. Таким образом, можно предположить, что образование шпильчатых структур повторами, склонными к приобретению вторичной структуры, в матрице для отстающей цепи или в новосинтезированной отстающей цепи с последующей задержкой синтеза приводит к нарушению репликации и последующему удалению или экспансии повторов (рис. 2*а*).

Дополнительное подтверждение экспансии повторов в отстающей цепи получено при изучении

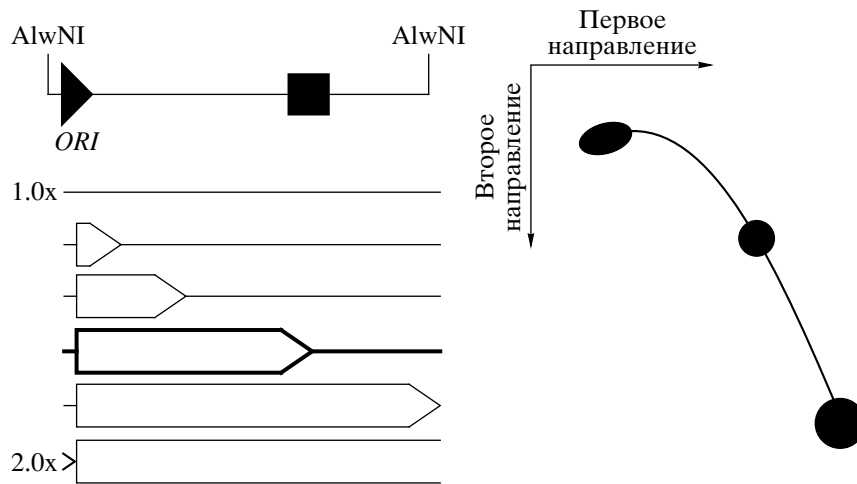


Рис. 3. Выявление связанной с повторами остановки репликации методом двумерного гель-электрофореза. Слева вверху схематически показана структура линейризованной плазмидной ДНК. Черный треугольник обозначает начало репликации, черный квадрат – клонированную повторяющуюся ДНК. Слева внизу показана форма различных промежуточных продуктов репликации. Жирным выделен продукт, наиболее часто накапливающийся при вызванном повторами подавлении репликации. Справа приведена схема пузырьковой арки с утолщением (“пятном”), соответствующим участку остановки репликации.

мутантов *rad27* дрожжей. Ген *rad27* кодирует так называемую замещающую эндонуклеазу (“flap-endonuclease”), участвующую в замене РНК-праймеров во фрагментах Оказаки [114], что необходимо для завершения синтеза отстающей цепи. Оказалось, что у делеционных мутантов *rad27* частота экспансии различных тринуклеотидных повторов заметно возрастает [115–117]. Было высказано предположение, что в отсутствие замещающей эндонуклеазы повтор-содержащий РНК-праймер для фрагмента Оказаки не разрушается, а просто замещается ДНК-полимеразой. Последующее сшивание этого праймера с 3'-концом другого фрагмента Оказаки приводит к экспансии повтора (рис. 2з). Следует заметить, что данная модель хорошо объясняет только относительно небольшое увеличение размера праймера Оказаки (~20 п. н.). Кроме того, у мутантов *rad27* повышение нестабильности не ограничено тринуклеотидными повторами, но наблюдается для всех изученных микросателлитов [118, 119].

Помимо модельных систем, важный аргумент в пользу репликационной модели получен в результате анализа ДНК членов семей с заболеваниями, связанными с тринуклеотидными повторами. У здоровых родственников больных синдромом ломкой Х-хромосомы повторы (CGG)_n обычно прерываются в нескольких местах триплетами AGG [120–122]. У носителей и больных эти повторы удлинены с 3'-, но не с 5'-конца, причем в удлиненной части отсутствуют вставки AGG [121, 122]. Сходные полярные и скрытые изменения выявлены при экспансии (CAG)_n-повторов у больных спинозжечковой атаксией [123].

Столь выраженная полярность может быть объяснена аномальной репликацией повторов с единственного прилежащего начала репликации при допущении различий в точности синтеза ведущей и отстающей цепей повторяющейся ДНК. Действительно, известно, что в некоторых повторах мутации возникают в основном в отстающей цепи ДНК [124].

Согласно репликационной модели экспансии репликация тринуклеотидных повторов происходит с нарушением координации между ведущей и отстающей цепями ДНК. Поскольку прямых данных о репликации тринуклеотидных повторов *in vivo* крайне мало, мы решили изучить способ прохождения репликативной вилки через тринуклеотидные повторы *in vivo* [125]. Мы предполагали, что повторы могут в какой-то степени замедлить прохождение вилки. К сожалению, проводить такие опыты сложно, поскольку в норме скорость репликации очень высока – она достигает 1000 п.н./с у бактерий и сотен п.н./с у эукариот [126]. Если, например, повтор длиной 100 п.н. в плазмиде pBR322 замедляет прохождение репликативной вилки в 10 раз, то время репликации всей плазмиды составит 6 с вместо 5 с. Следовательно, в этом случае общепринятые методы изучения репликации ДНК трудноприменимы.

Для решения этой проблемы мы изучили влияние различных повторов на репликацию бактериальных плазмид *in vivo* с использованием двумерного электрофореза (нейтральный/нейтральный) промежуточных продуктов репликации. Этот метод был разработан для картирования точек начала репликации [127, 128], но позже он

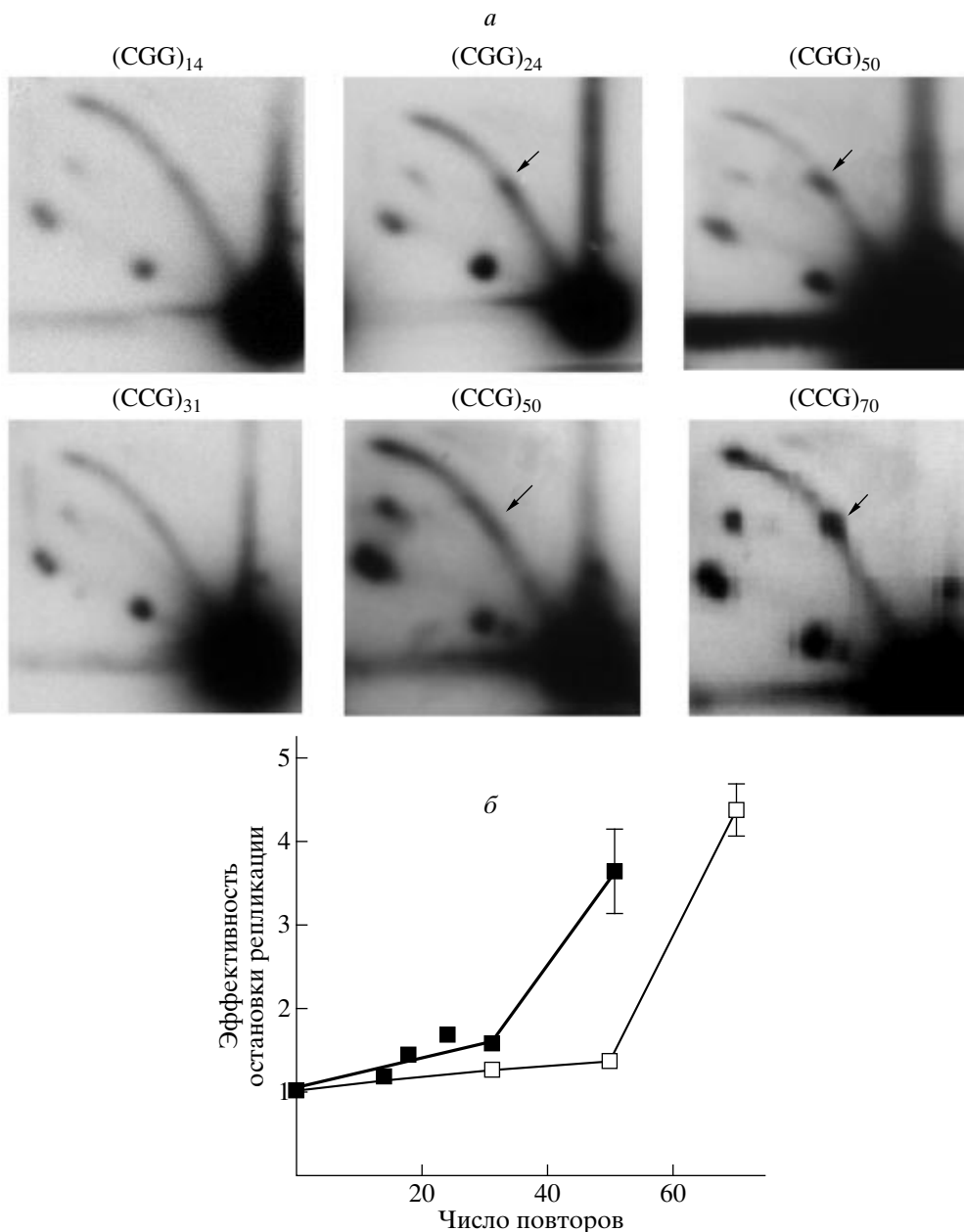


Рис. 4. Влияние повторов (CGG)_n · (CCG)_n на прохождение репликативной вилки *in vivo*. *a* – Анализ промежуточных продуктов репликации плазмид со вставками (CGG)_n · (CCG)_n методом двумерного электрофореза. Названия плазмид соответствуют последовательности матрицы отстающей цепи. Участки остановки репликации показаны стрелками. *b* – Количественный анализ интенсивности подавления репликации по результатам нескольких опытов. Показателем степени подавления служит отношение наблюдаемой плотности сигнала остановки к ожидаемой плотности равной линии арки в данном положении. Результаты, полученные для (CGG)_n и (CCG)_n, обозначены черными и белыми квадратами соответственно.

стал использоваться и для определения участков терминации репликации [129–131]. Бактериальные плазмиды были выбраны по двум соображениям: (1) репликация плазмид идет в одном направлении, что позволяет безошибочно определить ведущую и отстающую цепи ДНК; (2) репликация идет очень эффективно, что позволяет легко выделять и анализировать промежуточные продукты.

Схема анализа промежуточных продуктов репликации с помощью двумерного электрофореза показана на рис. 3. Промежуточные продукты репликации плазмиды имеют θ-форму. При расщеплении рестриктазой выше начала репликации они образуют пузыревидные (bubble) структуры, размер которых коррелирует с продолжительностью репликации. Пузыревидные промежуточ-

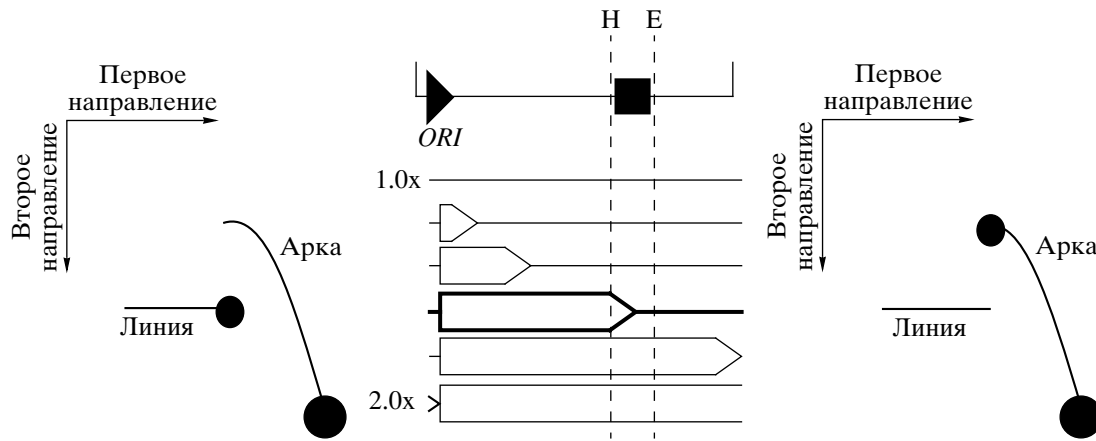


Рис. 5. Картирование участков остановки репликации с использованием обработки рестриктазами после первой стадии двумерного электрофореза (описание см. в тексте).

ные продукты различаются по форме и молекулярной массе (от 1 до 2 масс плазмиды). Их разделяют в двух направлениях: сначала по массе (агарозный гель низкой концентрации), затем по массе и форме (агароза высокой концентрации с бромистым этидием). Саузерн-блот-гибридизации с радиоактивно меченой плазмидой выявляет так называемую “пузырьковую арку”. Если репликация ДНК проходила без помех, арка ровная. Задержка репликативной вилки на $(CGG)_n$ -повторе приводит к накоплению промежуточного продукта, определенной формы и размера, и образованию утолщения на арке. Соотношение сигналов от этого утолщения и от ровной части кривой (relative stop signal, RSS) служит показателем вызванной повтором задержки движения репликативной вилки.

На рис. 4а показаны полученные нами результаты по прохождению репликативной вилки через повторы $(CGG)_n$ и $(CCG)_n$ у *Escherichia coli*. Учитывая однонаправленность репликации плазмидной ДНК, мы точно знали, какой из повторов – $(CGG)_n$ или $(CCG)_n$, находился в матрице для отстающей цепи, и в соответствии с этим давали названия плазмидам. Можно заметить, что удлинение повторов $(CGG)_n \cdot (CCG)_n$ приводит к появлению выраженных стоп-сигналов (показаны стрелками) на пузырьвидной арке. Количественные данные приведены на рис. 4б. Хорошо видно, что эффективность подавления репликации зависит от длины повтора и его ориентации относительно начала репликации. Интересно, что длина повтора, вызывающего значительную (≈ 5 раз) задержку репликации у бактерий, соответствует пороговой длине, необходимой для экспансии повтора у человека.

Чтобы подтвердить, что репликационная вилка действительно задерживается повторами $(CGG)_n \cdot (CCG)_n$ мы картировали участки остано-

вки репликации с использованием модифицированного метода электрофоретического анализа промежуточных продуктов репликации [132]. После электрофореза в первом направлении промежуточные продукты репликации расщепляли в геле рестриктазами, участки узнавания которых в плазмиде находились по разные стороны повтора. В результате фракция пузырьвидных промежуточных продуктов превратилась в идентичные у-образные продукты (рис. 5). При электрофорезе во втором направлении эти продукты двигались с одинаковой скоростью и после гибридизации с пробой, прилежащей к *ori* репликации, выявлялись в виде горизонтальной линии. Как видно из рис. 5, при расщеплении ДНК ниже повтора (относительно *ori*) на арке остается утолщение, в то время как при расщеплении выше повтора утолщение перемещается на горизонтальную линию.

Данные, полученные нами для вставки $(CGG)_{63} \cdot (CCG)_{63}$, представлены на рис. 6. Можно заметить, что при расщеплении промежуточных продуктов репликации рестриктазой *EcoRI* (участок узнавания ниже вставки) на арке остается утолщение. Напротив, при расщеплении *HindIII* утолщение смещается на горизонтальную линию (“пятно 1”). Таким образом, можно сделать вывод, что репликативная вилка задерживается в участке $(CGG)_{63} \cdot (CCG)_{63}$. Следует отметить, что расщепление *HindIII* приводит к образованию еще одного продукта (“пятно 2”), которое мигрирует вместе с “пятном 1” в первом направлении, но медленнее во втором, т.е. форма этого интермедиата сложнее у-образной, но проще пузырьвидной. Можно предположить, что появление “пятна 2” связано с фракцией промежуточных продуктов репликации, в которых еще не синтезирована отстающая цепь, окружающая участок узнавания *HindIII*. Частичное расщепление таких продуктов *HindIII* привело бы к накоплению мо-

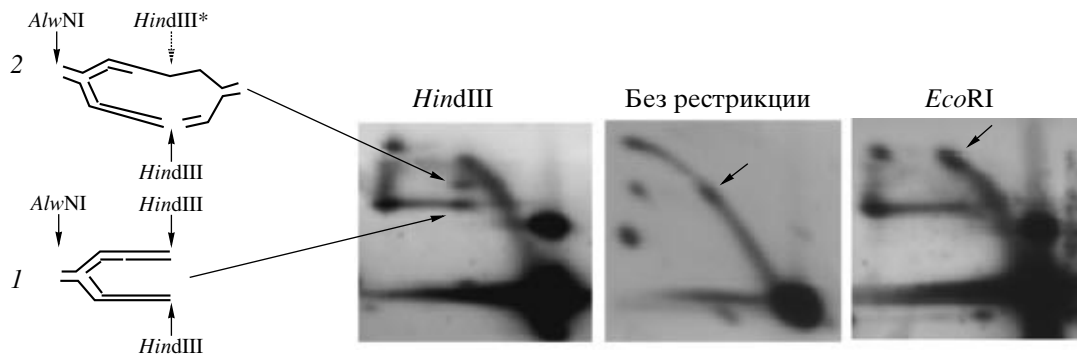


Рис. 6. Тонкое картирование участка останковки репликации в плазмиде $p(CGCG)_{63}$. В центре – без рестриктаз, справа – после расщепления *EcoRI*, слева – после расщепления *HindIII*. Участки останковки репликации показаны маленькими стрелками на пузырьковой арке. Длинные стрелки соответствуют продуктам, смещающимся к горизонтальной линии. 1 и 2 – схематическое изображение структуры продуктов, соответствующих “пятнам” 1 и 2 (объяснения в тексте).

лекул ДНК, имеющих форму бабочки (показано на диаграмме). Если это предположение верно, то существование “пятна 2” указывает на “недорепликацию” отстающей цепи в повторяющейся ДНК.

Применимы ли результаты, полученные при изучении репликации бактерий, к анализу экспансии повторов у человека? Как уже сказано, изучение повторов ДНК из ломкой X-хромосомы отдельных индивидов показало, что последовательности $(CGG)_n$ обычно прерываются несколькими тринуклеотидами AGG, что предотвращает экспансию [121]. Поэтому мы рассмотрели влияние AGG на репликацию повторов $(CGG)_n$ в нашей системе. Оказалось, что вставки AGG действительно устраняют задержку репликации. Повидимому, существует связь между особенностями репликации повтора $(CGG)_n$ у бактерий и способностью этого повтора к экспансии у человека.

Мы считаем, что связанные с синдромом ломкой X-хромосомы повторы CGG прямо влияют на движение репликативной вилки *in vivo*, причем это влияние зависит от длины и ориентации по-

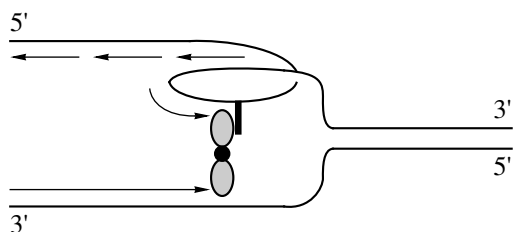


Рис. 7. Модель останковки репликативной вилки, вызванной образованием шпильки на матрице отстающей цепи. Стрелками показано направление синтеза ДНК. Шпилька на матрице отстающей цепи выделена черным прямоугольником, серыми эллипсами обозначены ДНК-полимеразы ведущей и отстающей цепи, черный кружок – белок (белки), связывающий полимеразы отстающей и ведущей цепи (например, τ -субъединицы голофермента ДНК-полимеразы III *E. coli*).

втора и в наибольшей степени выражено, когда склонный к образованию вторичной структуры повтор $(CGG)_n$ находится в матрице для отстающей цепи ДНК. Характерная зависимость от длины позволяет предположить, что задержка репликативной вилки связана скорее с необычной вторичной структурой, чем с первичной структурой ДНК *per se*. Прерывистый синтез отстающей цепи означает, что часть матрицы этой цепи (по размеру равная фрагменту Оказаки) должна быть, по крайней мере временно, одноцепочечной. Таким образом, повтор $(CGG)_n$ будет образовывать вторичную структуру с большей вероятностью, когда находится в матрице для отстающей, а не ведущей цепи. Поскольку считается, что синтез обеих цепей ДНК происходит координированно [126], задержка синтеза на отстающей цепи несомненно должна отразиться на репликативной вилке в целом (рис. 7).

Поскольку рассмотренные выше результаты получены на бактериальных клетках, закономерно задать вопрос, действительно ли тринуклеотидные повторы влияют на движение эукариотической репликативной вилки? Для ответа на этот вопрос мы решили изучить влияние тринуклеотидных повторов на репликацию в дрожжевой системе с использованием того же подхода – электрофоретического анализа промежуточных продуктов репликации. Оказалось, что повторы $(CGG)_n \cdot (CCG)_n$ замедляют репликативную вилку у дрожжей так же, как у бактерий (М. Красильникова и Г. Самадшвили, не опубликовано). Таким образом, мы полагаем, что влияние тринуклеотидных повторов на репликацию ДНК у про- и эукариот *in vivo* в основном одинаково.

Помимо репликации, экспансия тринуклеотидных повторов может быть связана с процессом рекомбинации. Во-первых, в результате неравного кроссинговера могут образоваться tandemные повторы различной длины (рис. 8a). Однако такой механизм вряд ли объясняет экс-

пансию повторов. Очевидно, что неравный кроссинговер при мейозе можно исключить из числа возможных механизмов экспансии, поскольку экспансия не сопровождается обменом близлежащих фланкирующих последовательностей [133]. Неравный кроссинговер сестринских хроматид при митозе не может быть исключен с полной уверенностью, хотя он должен приводить к образованию равного числа удлиненных и укороченных вариантов в тринуклеотидных повторах, что никогда не наблюдали.

Во-вторых, экспансии повторяющихся последовательностей может способствовать генная конверсия, вызванная двуцепочечным разрывом внутри этой последовательности или рядом с ней (рис. 8б). Как и в случае обмена сестринских хроматид, при этом должны образовываться как удлиненные, так и укороченные аллели. Известно однако, что генная конверсия часто бывает направленной (полярной), поэтому она может привести к преобладанию удлиненных последовательностей над укороченными. Генно-конверсионная модель привлекла широкое внимание недавно, когда было показано, что тринуклеотидный повтор $(CTG)_n \cdot (CAG)_n$ обладает повышенной рекомбиногенностью в клетках *E. coli* [135] и, по всей видимости, удлиняется при рекомбинации, вызванной двуцепочечными разрывами у дрожжей [136].

Можно думать о существовании связи между стимуляцией генной конверсии повторами и аномалиями в их репликации. Убедительно показано, что замедление или остановка репликативной вилки в специфических участках ДНК может стимулировать рекомбинацию [137]. В свою очередь, повышенная рекомбинационная активность может способствовать восстановлению движения репликативной вилки. Хотя детали механизма взаимодействия процессов репликации и рекомбинации еще непонятны, однако наибольшей популярностью пользуются две модели. В соответствии с первой моделью задержка репликативной вилки приводит к образованию стабильного открытого одноцепочечного фрагмента матрицы отстающей цепи (рис. 9а). Разрыв в этом одноцепочечном фрагменте может создать субстрат для рекомбинационного внедрения в другой ДНК-дуплекс. По второй модели задержка репликативной вилки может вызвать диссоциацию обеих новосинтезированных цепей ДНК и их самоотжиг. В результате репликативная вилка подвергнется так называемому коллапсу [138] и станет похожа на структуру Холлидея стабилизируемую, возможно, комплексом RuvAB (рис. 9б). Процессинг такой псевдоструктуры Холлидея ферментами рекомбинации может привести к удлинению или укорачиванию повторов.

Необходимо отметить, что ни репликационная, ни рекомбинационная модели не могут удов-

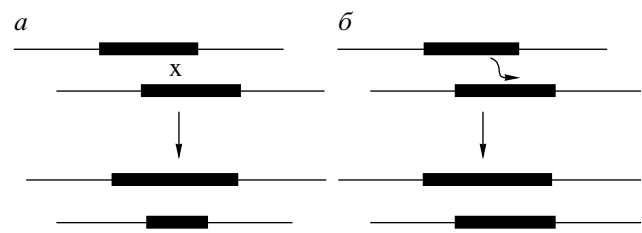


Рис. 8. Рекомбинационные модели экспансии тринуклеотидных повторов. *a* – Неравный кроссинговер. *б* – Генная конверсия. Линии соответствуют двухцепочечным молекулам ДНК. Повторяющиеся участки выделены черными прямоугольниками.

летворительно объяснить выраженную тенденцию к экспансии тринуклеотидных повторов при их передаче в ряду поколений у человека. Это явление пока не удалось воспроизвести в подходящих экспериментальных системах. В культурах соматических клеток длина тринуклеотидных повторов поддерживается на постоянном уровне. В модельных бактериальных и дрожжевых системах частота экспансии различных тринуклеотидных повторов относительно низка, более того, укорачивание повторов наблюдается значительно чаще, чем экспансия. Мы можем предложить три возможные объяснения этого несоответствия.

Во-первых, экспансия повторов может происходить в основном в специализированных клеточных линиях и (или) на определенных стадиях развития человека. Например, можно думать, что экспансия происходит в ходе гаметогенеза. Эта гипотеза в целом подтверждается результатами анализа полиморфизма для повторов из индивидуального сперматозоида. Показано, что при спинномозжечковой атаксии типов 1 и 7 [139, 140], спинобульбарной мышечной атрофии [141] и болезни Гентингтона [142, 143] полиморфизм длин повторов в сперматозоидах намного выше, чем в соматических клетках. Более того, повторы из сперматозоидов обладают выраженной тенденцией к экспансии. Если экспансия тринуклеотидных повторов происходит в основном в процессе сперматогенеза, это легко объясняет характерную для перечисленных заболеваний передачу по отцовской линии. Передача по материнской линии, в свою очередь, может быть объяснена преимущественной экспансией повторов в ходе оогенеза. Несколько более сложный механизм передачи по материнской линии характерен для синдрома ломкой X-хромосомы. У мужчин, носителей премутации, тринуклеотидные повторы в гене *FMR1* имеют тенденцию к экспансии в процессе сперматогенеза [144], в то время как в сперматозоидах мужчин с полноценной мутацией повторы укорачиваются до премутационного размера [145]. Можно предположить, что при сперматогенезе происходит отбор клеток, экспрессирующих ген *FMR1*, что препятствует образованию повторов

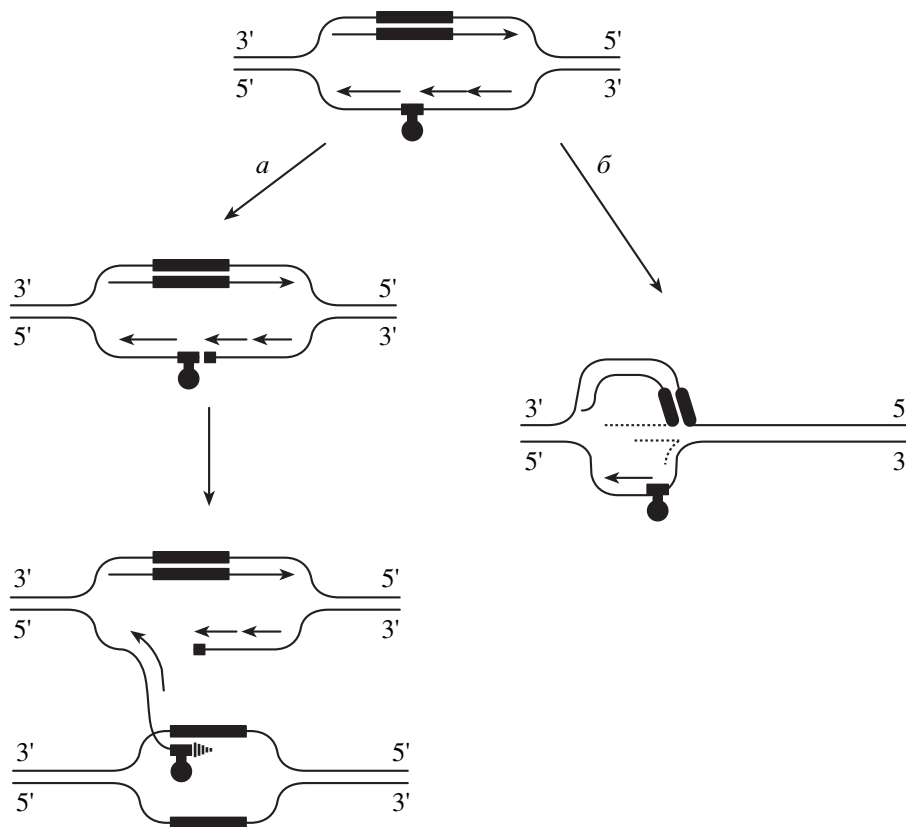


Рис. 9. Подавление репликации при синтезе отстающей цепи ДНК может стимулировать рекомбинацию и привести к экспансии повтора. *a* – Разрыв в повторяющемся участке матрицы для отстающей цепи может инициировать внедрение цепи в гомологичный дуплекс с последующей экспансией. *б* – Коллапс остановленной репликативной вилки приводит к образованию структуры, подобной структуре Холлидея, которая далее может подвергаться рекомбинации. Тринуклеотидные повторы показаны черными прямоугольниками. Стрелками указано направление синтеза ДНК. Новосинтезированные цепи ДНК, которые отжигаются после коллапса репликативной вилки, изображены штриховыми линиями.

размером больше премутационного. В результате удлиненные повторы не передаются от отца к дочери.

Экспансия возможна также на очень ранних стадиях эмбрионального развития. На этих стадиях ДНК реплицируется чрезвычайно быстро [146], что может отрицательно влиять на точность репликации и приводить к экспансии повторов. Объяснить связанную с полом передачу заболевания по этой гипотезе можно, допустив импринтинг отцовского или материнского аллеля гена, содержащего повтор.

Второе объяснение основано на данных о способности определенных мутаций в аппарате репликации увеличивать степень экспансии повторов. Можно предположить, что семьи с заболеваниями, связанными с триплетными повторами, являются носителями дополнительных мутаций в генах репликационного аппарата, которые способствуют экспансии повторов. Примером может служить мутация *rad27*, которая незначительно влияет на эффективность репликации у дрожжей, но резко увеличивает скорость экспансии различных тринуклеотидных повторов. Это предположе-

ние не лишено слабых мест. Например, как правило, в одной семье происходит экспансия повторов только одного типа, что заставляет предположить, что разные “молчащие” репликационные мутации должны по-разному влиять на экспансию различных повторов. В настоящее время такие мутации не известны. Заметим, что два рассмотренных объяснения не являются взаимоисключающими. Вполне возможно, что “молчащие” репликационные мутации влияют на репликацию повторов преимущественно при гаметогенезе или на ранних стадиях эмбриогенеза.

Наконец, может, по-видимому, существовать отбор на экспансию определенного повтора у людей, предрасположенных к заболеванию, связанному с этим триплетным повтором. Такой отбор может быть следствием, например, мутации, приводящей к резкому увеличению синтеза повторсвязывающего белка, что отрицательно влияет на гаметогенез и (или) эмбриональное развитие. Это давало бы преимущество гаметам или ранним эмбрионам, несущим аллели с удлиненными повторами. Известны белки, специфически связывающие триплетные повторы как в ДНК [147, 148], так

и в РНК [70, 149]. Как описано выше, как минимум один из них – CUGBP1, может влиять на экспрессию ряда генов на уровне сплайсинга [71]. Сверхэкспрессия генов повтор-связывающих белков, которые участвуют в регуляции важных клеточных генов, скорее всего будет неблагоприятна для клетки, но может быть скомпенсирована экспансией соответствующего повтора.

Таким образом, существует несколько моделей, объясняющих возможные механизмы экспансии повторов. Однако в настоящее время ни одна из них не может удовлетворительно объяснить, почему в ряду поколений человека наблюдается экспансия только одного тринуклеотидного повтора при наличии большого числа других повторов с той же нуклеотидной последовательностью в геноме. Это означает, что тонкие детали молекулярного механизма экспансии повторов остаются невыясненными. Другая нерешенная задача – установление связи между сведениями об экспансии повторов, полученными в модельных системах или *in vitro*, с этиологией экспансии повторов у человека. Эта новая область генетики сейчас быстро развивается, поэтому в ближайшем будущем можно с полной уверенностью ожидать крупных достижений в обоих направлениях.

Мы благодарим сотрудников нашей лаборатории в Чикаго – М. Красильникову, Г. Расу, Г. Самадашвили за неоценимый вклад в изучение тринуклеотидных повторов, а также Дж. Булдака за редактирование рукописи.

Работа поддержана Национальным научным фондом США (МСВ-9723924).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Imbert G., Feng Y., Nelson D.L. et al. // Genetics Instabilities and Hereditary Neurological Disorders / Eds Wells R.D., Warren S.T. San Diego: Academic Press, 1998. P. 27–53.
2. Hagerman R. // Genetics Instabilities and Hereditary Neurological Disorders / Eds Wells R.D., Warren S.T. San Diego: Academic Press, 1998. P. 3–87.
3. Sutherland G.R., Hecht F. // Fragile sites on chromosomes. N.Y.: Oxford Univ. Press, 1985.
4. Van Dyke D.L., Weiss L. // Am. J. Med. Genet. 1986. V. 23. P. 723–737.
5. Sherman S.L., Jacobs P.A., Morton N.E. et al. // Hum. Genet. 1985. V. 69. P. 289–299.
6. Sherman S.L., Morton N.E., Jacobs P.A., Turner G. // Ann. Hum. Genet. 1984. V. 48. P. 21–37.
7. Verkerk A.J.M.H., Pieretti M., Sutcliffe J.S. et al. // Cell. 1991. V. 65. P. 905–914.
8. Kremer E.J., Pritchard M., Lynch M. et al. // Science. 1991. V. 252. P. 1711–1714.
9. Howeler C.J., Busch H.F., Geraedts J.P. et al. // Brain. 1989. V. 112. P. 779–797.
10. Brooks B.P., Fischbeck K.H. // Trends Neurosci. 1995. V. 18. P. 459–461.
11. Goldberg Y.P., Telenius H., Hayden M.R. // Current Opin. Neurol. 1994. V. 7. P. 325–332.
12. Pandolfo M. // Neuromuscul. Disorders. 1998. V. 8. P. 409–415.
13. Gindilis V.M., Shakhmatova-Pavlova I.V. // Vest. Akad. Med. Nauk SSSR. 1979. V. 7. P. 14–23.
14. Bassett A.S., Honer W.G. // Am. J. Hum. Genet. V. 54. P. 864–870.
15. Ross C.A., McInnis M.G., Margolis R.L., Li S.H. // Trends Neurosci. 1993. V. 16. P. 254–260.
16. Laloti M.D., Scott H.S., Buresi C. et al. // Nature. 1997. V. 386. P. 847–851.
17. Kooy F., Willemsen R., Oostra B.A. // Molec. Medicine Today. 2000. V. 6. P. 193–198.
18. Subramanian P.S., Nelson D.L., Chinault A.C. // Am. J. Hum. Genet. 1996. V. 59. P. 407–416.
19. Hornstra I.K., Nelson D.L., Warren S.T., Yang T.P. // Hum. Mol. Genet. 1993. V. 2. P. 1659–1665.
20. De Boulle K., Verkerk A.J.E.R. et al. // Nature Genet. 1993. V. 3. P. 31–35.
21. Devys D., Lutz Y., Rouyer N. et al. // Nature Genet. 1993. V. 4. P. 335–340.
22. Khandjian E.W., Corbin F., Woerly S., Rousseau F. // Nature Genet. 1996. V. 12. P. 91–93.
23. Ashley C.J., Wilkinson K.D., Reines D., Warren S.T. // Science. 1993. V. 262. P. 563–566.
24. Feng Y., Gutkunst C.A., Eberhart D.E. et al. // J. Neurosci. 1997. V. 17. P. 1539–1547.
25. Comery T.A., Harris J.B., Willems P.J. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 5401–5404.
26. The Huntington's Disease Collaborative Research Group // Cell. 1993. V. 72. P. 971–983.
27. LaSpada A.R., Wolson E.M., Lubahn D.B. et al. // Nature. 1994. V. 352. P. 77–79.
28. Orr H.T., Chung M.Y., Banfi S. et al. // Nature Genet. 1993. V. 4. P. 221–226.
29. Chung M.Y., Ranum L.P., Duvick L.A. et al. // Nature Genet. 1993. V. 5. P. 254–258.
30. Koide R., Ikeuchi T., Onodera O. et al. // Nature Genet. 1994. V. 6. P. 9–13.
31. Lunkes A., Trottier Y., Mandel J.L. // Essays Biochem. 1998. V. 33. P. 149–163.
32. Bates G. // Biochem. 1996. V. 18. P. 175–178.
33. Kahlem P., Green H., Djian P. // Mol. Cell. 1998. V. 1. P. 595–601.
34. Green H. // Cell. 1993. V. 74. P. 955–956.
35. Perutz M.F., Johnson T., Suzuki M., Finch J.T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 5355–5358.
36. Paulson H.L., Perez M.K., Trottier Y. et al. // Neuron. 1997. V. 19. P. 333–334.
37. Skinner P.J., Koshy B., Cummings C. et al. // Nature. 1997. V. 389. P. 971–974.
38. Ikeda H., Yamaguchi M., Sugai S. et al. // Nature Genet. 1996. V. 13. P. 196–202.
39. Lunkes A., Mandel J.L. // Hum. Mol. Genet. 1998. V. 7. P. 1355–1361.
40. Faber P.W., Alter J.R., MacDonald M.E., Hart A.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 179–184.
41. Warrick J.M., Paulson H.L., Gray-Board G.L. et al. // Cell. 1998. V. 93. P. 939–949.

42. Jackson J.R., Salecker I., Dong X. et al. // *Neuron*. 1998. V. 21. P. 633–642.
43. Burrig E.N., Clark H.B., Servadio A. et al. // *Cell*. 1995. V. 82. P. 937–948.
44. Klement I.A., Skinner P.J., Kaytor M.D. et al. // *Cell*. 1998. V. 95. P. 41–53.
45. Mangiarini L., Sathasivam K., Seller M. et al. // *Cell*. 1996. V. 87. P. 493–506.
46. Zoghbi H.Y., Orr H.T. // *Annu. Rev. Neurosci.* 2000. V. 23. P. 217–247.
47. Mhatre A.N., Trifiro M.A., Kaufman M. et al. // *Nature Genet.* 1993. V. 5. P. 185–188.
48. Campuzano V., Montermini L., Molto M.D. et al. // *Science*. 1996. V. 271. P. 1423–1427.
49. Campuzano V., Montermini L., Lutz Y. et al. // *Hum. Mol. Genet.* 1997. V. 6. P. 1771–1780.
50. Ohshima K., Montermini L., Wells R.D., Pandolfo M. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 14588–14595.
51. Bidichandani S.I., Ashizawa T., Patel P.I. // *Am. J. Hum. Genet.* 1998. V. 62. P. 111–121.
52. Grabczyk E., Usdin K. // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. P. 2815–2822.
53. Pandolfo M. // *Arch. Neurol.* 1999. V. 56. P. 1201–1208.
54. Cossee M., Campuzano V., Koutnikova H. et al. // *Nature Genet.* 1997. V. 15. P. 337–338.
55. Babcock M., de Silva D., Oaks R. et al. // *Science*. 1997. V. 276. P. 1709–1712.
56. Wilson R.B., Roof D.M. // *Nature Genet.* 1997. V. 16. P. 352–357.
57. Lamarche J.B., Shapcott D., Cote M., Lemieux B. // *Handbook of Cerebellar Diseases* / Ed. Lechtenberg R. N.Y.: Marcel Dekker, 1993. P. 453–458.
58. Waldvogel D., van Gelderen P., Hallet M. // *Ann. Neurol.* 1999. V. 46. P. 123–125.
59. Rotig A., deLonlay P., Chretien D. // *Nature Genet.* 1997. V. 17. P. 214–217.
60. Mahadevan M., Tsilfidis C., Sabourin L. et al. // *Science*. 1992. V. 255. P. 1253–1255.
61. Brook J.D., McCurrach M.E., Harley H.G. et al. // *Cell*. 1992. V. 68. P. 799–808.
62. Davis B.M., McCurrach M.E., Taneja K.L. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 7388–7393.
63. Reddy S., Smith D.B.J., Rich M.M. et al. // *Nature Genet.* 1996. V. 13. P. 325–335.
64. Jansen G., Groenen P.J.T.A., Bacher D. et al. // *Nature Genet.* 1996. V. 13. P. 316–324.
65. Klesert T.R., Otten A.D., Bird T.D., Tapscott S.J. // *Nature Genet.* 1997. V. 16. P. 402–406.
66. Thornton C.A., Wymer J.P., Simmons Z. et al. // *Nature Genet.* 1997. V. 16. P. 407–409.
67. Klessert T.R., Cho D.H., Clark J.I. et al. // *Nature Genet.* 2000. V. 25. P. 105–109.
68. Sarkar P.S., Appukuttan B., Han J. et al. // *Nature Genet.* 2000. V. 25. P. 110–114.
69. Timchenko L.T. // *Am. J. Hum. Genet.* 1999. V. 64. P. 360–364.
70. Timchenko L.T., Miller J.W., Timchenko N.A. et al. // *Nucleic Acids Res.* 1996. V. 24. P. 4407–4414.
71. Philips A.V., Timchenko L.T., Cooper T.A. // *Science*. 1998. V. 280. P. 737–741.
72. Timchenko N.A., Welm A.L., Lu X., Timchenko L.T. // *Nucleic Acids Res.* 1999. V. 27. P. 4517–4525.
73. Tian B., White R.J., Xia T. et al. // *RNA*. 2000. V. 6. P. 79–87.
74. Mankodi A., Logigian E., Callahan L. et al. // *Science*. 2000. V. 289. P. 1769–1772.
75. Raca G., Siyanova E.Y., McMurray C.T., Mirkin S.M. // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. P. 3943–3949.
76. McMurray C.T. // *Chromosoma*. 1995. V. 104. P. 2–12.
77. Vologodskii A. *Topology and physics of circular DNA*. Boca Raton: CRC Press, 1992. 179 p.
78. Kohwi Y., Wang H., Kohwi-Shigematsu T. // *Nucleic Acids Res.* 1993. V. 21. P. 5651–5655.
79. Mitchell J.E., Newbury S.F., McClellan J.A. // *Nucleic Acids Res.* 1995. V. 23. P. 1876–1881.
80. Petruska J., Arnheim N., Goodman M.F. // *Nucleic Acids Res.* 1996. V. 24. P. 1992–1998.
81. Yu A., Dill J., Wirth S.S. et al. // *Nucleic Acids Res.* 1995. V. 23. P. 2706–2714.
82. Yu A., Barron M.D., Romero R.M. et al. // *Biochemistry*. 1997. V. 36. P. 3687–3699.
83. Zheng M., Huang X., Smith G.K. et al. // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 264. P. 323–336.
84. Gacy A.M., Goellner G., Juranic N. et al. // *Cell*. 1995. V. 81. P. 533–540.
85. Chen X., Mariappan S.V., Catasti P. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. P. 5199–5203.
86. Usdin K. // *Nucleic Acids Res.* 1998. V. 26. P. 4078–4085.
87. Gacy A.M., Goellner G.M., Spiro C. et al. // *Mol. Cell*. 1998. V. 1. P. 583–593.
88. Sakamoto N., Chastain P.D., Parniewski P. et al. // *Mol. Cell*. 1999. V. 3. P. 465–475.
89. Mathern P., Goldmuntz E.A., Zha H. et al. // *Biochem. Genet.* 1993. V. 31. P. 441–448.
90. Olds R.J., Lane D.A., Chowdhury V. et al. // *Hum. Mutat.* 1994. V. 4. P. 31–41.
91. Banfi S., Servadio A., Chung M.Y. et al. // *Nature Genet.* 1994. V. 7. P. 513–520.
92. Burke J.R., Wingfield M.S., Lewis K.E. et al. // *Nature Genet.* 1994. V. 7. P. 521–524.
93. Zhang L., Leeflang E.P., Yu J., Arnheim N. // *Nature Genet.* 1994. V. 7. P. 531–535.
94. Subramony S.H. // *Current Opin. Neurol.* 1994. V. 7. P. 316–322.
95. Samadashwily G.M., Dayn A., Mirkin S.M. // *EMBO J.* 1993. V. 12. P. 4975–4983.
96. Dayn A., Samadashwily G.M., Mirkin S.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. V. 89. P. 11406–11410.
97. Krasilnikov A.S., Panyutin I.G., Samadashwily G.M. et al. // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 1339–1346.
98. Baran N., Lapidot A., Manor H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. P. 507–511.
99. Gerber H.P., Seipel K., Georgiev O. et al. // *Science*. 1994. V. 263. P. 808–811.
100. Armour J.A., Neumann R., Gobert S., Jeffreys A.J. // *Hum. Mol. Genet.* 1994. V. 3. P. 599–565.
101. Peter M., Michon J., Vielh P. et al. // *Int. J. Cancer*. 1992. V. 52. P. 544–548.
102. Kohwi Y., Panchenko Y. // *Genes Dev.* 1993. V. 7. P. 1766–1778.

103. Rooney S.M., Moore P.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 2141–2144.
104. Wahls W.P., Wallace L.J., Moore P.D. // Mol. Cell. Biol. 1990. V. 10. P. 785–793.
105. Weinreb A., Collier D.A., Birshtein B.K., Wells R.D. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 1352–1359.
106. Wahls W.P., Wallace L., Moore P.D. // Cell. 1990. V. 607. P. 95–103.
107. Kunkel T.A. // Nature. 1993. V. 365. P. 207–208.
108. Kang S., Ohshima K., Shimizu M. et al. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 27014–27021.
109. Usdin K., Woodford K.J. // Nucleic Acids Res. 1995. V. 237. P. 4202–4209.
110. Ohshima K., Wells R.D. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 16798–16806.
111. Shimizu M., Kubo K., Matsumoto U., Shindo H.J. // Mol. Biol. 1994. V. 235. P. 185–197.
112. Freudenreich C.H., Stavenhagen J.B., Zakian V.A. // Mol. Cell. Biol. 1997. V. 17. P. 2090–2098.
113. Kang S., Ohshima K., Jawooski A., Wells R.D.J. // Mol. Biol. 1996. V. 258. P. 543–547.
114. Gordenin D.A., Kunkel T.A., Resnick M.A. // Nature Genet. 1997. V. 16. P. 116–118.
115. White P.J., Borts R.H., Hirst M.C. // Mol. Cell. Biol. 1999. V. 19. P. 5675–5684.
116. Schweitzer J.K., Livingston D.M. // Hum. Mol. Genet. 1998. V. 7. P. 69–74.
117. Schweitzer J.K., Livingston D.M. // Genetics. 1999. V. 152. P. 953–963.
118. Kokoska R.J., Stefanovic L., Tran H.T. et al. // Mol. Cell. Biol. 1998. V. 18. P. 2779–2788.
119. Parenteau J., Wellinger R.J. // Mol. Cell. Biol. 1999. V. 19. P. 4143–4152.
120. Reuss A.L., Kazazian H.Jr., Krebs C.M. et al. // Hum. Mol. Genet. 1994. V. 3. P. 393–398.
121. Kunst C.B., Warren S.T. // Cell. 1994. V. 77. P. 853–861.
122. Snow K., Tester D.J., Kruckeberg K.E. et al. // Hum. Mol. Genet. 1994. V. 3. P. 1543–1551.
123. Jodice C., Malaspina P., Persichetti F. et al. // Am. J. Hum. Genet. 1994. V. 54. P. 959–965.
124. Trinh T.Q., Sinden R.R. // Nature. 1991. V. 352. P. 544–547.
125. Samadashwily G.M., Raca G., Mirkin S.M. // Nature Genet. 1997. V. 17. P. 298–304.
126. Kornberg A., Baker T. DNA Replication. 2nd. ed. N.Y.: W.H. Freeman and Co., 1992. 931 p.
127. Brewer B.J., Fangman W.L. // Cell. 1987. V. 51. P. 463–471.
128. Huberman J.A., Spotila L.D., Nawotka K.A. et al. // Cell. 1987. V. 51. P. 473–481.
129. Zhu L.J., Newlon C.S., Huberman J.A. // Mol. Cell. Biol. 1992. V. 12. P. 4733–4741.
130. Little R.D., Platt T.H., Schildkraut C.L. // Mol. Cell. Biol. 1993. V. 13. P. 6600–6613.
131. McAllister T., Khatri G.S., Bastia D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 2828–2832.
132. Friedman K.L., Brewer B.J. // Methods Enzymol. 1995. V. 262. P. 613–627.
133. Richards R.I., Holman K., Friend K. et al. // Nature Genet. 1992. V. 1. P. 257–260.
134. Paques F., Haber J.E. // Microb. Molec. Biol. Rev. 1999. V. 63. P. 349–404.
135. Jakupciak J.P., Wells R.D. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 23468–23479.
136. Richard G.-F., Goellner G.M., McMurray C.T., Haber J.E. // EMBO J. 2000. V. 19. P. 2381–2390.
137. Michel B. // Trends Biol Sci. 2000. V. 25. P. 173–178.
138. Kuzminov A. // Mol. Microbiol. 1995. V. 16. P. 373–384.
139. Monckton D.G., Cayuela M.L., Gould F.K. et al. // Hum. Mol. Genet. 1999. V. 8. P. 2473–2478.
140. Koefoed P., Jasjolt L., Fenger K. et al. // Hum. Genet. 1998. V. 103. P. 564–569.
141. Grewal R.P., Leeflang E.P., Zhang L., Arnheim N. // Neurogenetics. 1998. V. 1. P. 249–252.
142. Leeflang E.P., Tavare S., Marjoram P. et al. // Hum. Mol. Genet. 1999. V. 8. P. 173–183.
143. Telenius H., Kremer B., Goldberg Y.P. et al. // Nature Genet. 1994. V. 6. P. 409–414.
144. Nolin S.L., Houck G.E.J., Gargano A.D. et al. // Am. J. Hum. Genet. 1999. V. 65. P. 680–688.
145. Reyniers E., Vits L., De Boulle K. et al. // Nature Genet. 1993. V. 4. P. 143–146.
146. Satoh N. // Differentiation. 1982. V. 22. P. 156–163.
147. Yano H., Wang B.E., Ahmad I., Zhang J. et al. // Exp. Cell. Res. 1999. V. 251. P. 388–400.

Expansion of Trinucleotide Repeats

E. Yu. Siyanova and S. M. Mirkin

This review describes a novel type of genome instability, expansion of trinucleotide repeats. Originally discovered in 1991 upon cloning the gene responsible for the fragile X syndrome, it appeared to be a general phenomenon responsible for a growing number of human neurological disorders. Besides apparent medical importance, the discovery of trinucleotide repeat expansion unraveled a fundamental problem of human genetics: a non-Mendelian type of inheritance called anticipation. Understanding the mechanisms of repeat expansion and the molecular pathways leading from these expansions to human diseases became a formidable task for modern biology and one of its spectacular achievements. Here we discuss the major breakthroughs in this field made during the last decade with an emphasis on molecular models of repeat expansion.