

УДК 577.21

ХРОСОМОМА 3 ЧЕЛОВЕКА: ПОИСК МИКРОСАТЕЛЛИТОВ ДИ-, ТРИ- И ТЕТРАМЕРНЫХ МОТИВОВ, АНАЛИЗ ИХ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ И ФОРМИРОВАНИЕ МАРКЕРОВ

© 1997 г. Э. А. Брага*, Е. Ю. Котова, Е. М. Пугачева, Р. З. Гизатуллин¹, В. И. Кашуба¹, М. И. Лерман², М. Г. Аксенова, И. А. Ефремов, Е. Р. Забаровский^{1,3}, Л. Л. Киселев³

Государственный научный центр Российской Федерации "ГосНИИ генетика", Москва, 113545

¹Каролинский институт, Стокгольм, Швеция, 17177

²Национальный институт рака, Центр исследования рака и развития, Фредерик, Мэриленд, 21702-1201, США

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 117984

Поступила в редакцию 03.06.97 г.

ДНК-вставки из 150 *NotI*-связующих и *NotI*-прыжковых клонов, локализованных на хромосоме 3, и контиг из 22 перекрывающихся космид, расположенных в области гомозиготных делеций в мелко-клеточной карциноме легкого (570 т.п.н., локус Зр21.3), анализировали на присутствие микросателлитов девяти мотивов. В ДНК обеих групп клонов выявлено трехкратное относительно генома человека в целом снижение частоты встречаемости СА-повторов и повышение частоты встречаемости мотивов CAG, GGA, AAT, CAC, AAAG, AATG и GATG. Определены нуклеотидные последовательности субклонированных фрагментов ДНК клонов NL1-212, NLM-216, NL-026, J32-135H и космид 6, 7 и 16 (более 11 т.п.н.). Исследован аллельный полиморфизм 10 локусов микросателлитов, идентифицированных в последовательностях ДНК клонов хромосомы 3, а также восьми локусов (CAG/CTG)_n, отобранных среди кДНК мозга (GenBank). Отмечено низкое содержание полиморфных локусов вблизи *NotI*-участков (1 из 7), и в кДНК (1 из 8). Этот феномен, а также особенности распределения некоторых мотивов указывают на обогащение генами ДНК *NotI*-связующих и прыжковых клонов хромосомы 3 и космид из области Зр21.3. Созданы два полиморфных и девять STS-маркеров хромосомы 3, из которых три маркера относятся к области, вовлеченной в канцерогенез, и четыре – к генам; полиморфные маркеры относятся к гомологу гена рецептора нейропептида Y-Y1 мыши (гомология 93.5%, 62 п.н.), и к гену, экспрессирующемуся в мозге, EST04896.

Ключевые слова: хромосома 3 человека, *NotI*-связующие и *NotI*-прыжковые клоны, ди-, три- и тетрамерные микросателлиты, маркеры генов, канцерогенез.

Полиморфные микросателлиты, расположенные внутри или вблизи генов, надежнее для выяснения роли исследуемого гена в возникновении заболевания по сравнению с генетически сцепленными, но физически удаленными маркерами [1–3]. Маркеры на основе таких локусов применяют также для локализации гена методом скрининга панелей гибридных клеточных линий и разнообразных клонок с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) [2, 3]. Ранее для нуклеотидных последовательностей, прилежащих к *NotI*-участкам в *NotI*-связующих и *NotI*-прыжковых клонах хромосомы 3 человека [4, 5], показано повышенное содержание CpG-островов и последовательностей, гомологичных мРНК и известным

генам [6, 7]. В связи с этим для создания маркеров к генам хромосомы 3 проведен компьютерный поиск микросателлитов среди коллекции таких последовательностей (около 1000 участков ДНК по 200–600 п.н.) и скрининг методом гибридизации набора из 150 *NotI*-связующих и *NotI*-прыжковых клонов, субрегионально локализованных на хромосоме 3 [8–16]. Для анализа особенностей распределения микросателлитов на хромосоме 3 в районе *NotI*-участков проведен также скрининг двух *NotI*-связующих клонок генома человека, двух клонок кДНК и нуклеотидных последовательностей кДНК и генома человека, содержащихся в базах данных (GenBank).

Вторая важная задача данного исследования – создание маркеров в области, вовлеченной в развитие рака легкого, почки и других органов и относящейся к району Зр21.3 [17, 18]. Предполагают [19], что делеции в этой зоне отвечают за перерождение аденомы почки в рак [19]. Именно в этом районе найдены гомозиготные делеции в

* Эл. почта: EBraga@vnigen.msk.su

Примечание при корректуре. В предыдущей работе авторов (1997. Т. 31. № 5. С. 805–809) по вине авторов пропущено название организации, в которой работает один из авторов – Е.Р. Забаровский – Институт молекулярной биологии Российской академии наук, Москва, 117989

клетках карциномы легкого [20–22] и опухолеподавляющая активность делетируемых областей [23, 24]. Сконструирован и картирован контиг 23 космид и фага P1 (700 т.п.н.), содержащий зону перекрытия гомозиготных делеций (370 т.п.н.) и ее фланги, и в этом участке ДНК ведется поиск потенциальных генов-супрессоров рака легкого [25]. Идентифицирована 21 транскрибируемая нуклеотидная последовательность, 15 новых и 2 известных гена, а также 24 CpG-острова [25]. Формирование в этой важной зоне полиморфных и STS-маркеров необходимо для анализа и картирования потенциальных генов-супрессоров.

В исследовании использованы микросателлиты, главным образом, три- и тетра-нуклеотидных мотивов, которые так же информативны, как динуклеотидные (полиморфны половина локусов с числом повторов не менее семи) [26, 27]. Кроме того, благодаря большей длине мономера, они удобнее, чем динуклеотидные, для изучения с помощью электрофореза в 12%-ном ПААГ с окрашиванием продуктов ПЦР серебром [28]. При выборе проб для поиска микросателлитов в первую очередь исключены мотивы GATA и GGAA, наиболее широко применявшиеся Центрами CHLC (Cooperative Human Linkage Center) и UT (The Utah Marker Development Group) при создании коллекции маркеров генома человека [29–32]. Среди использованных нами мотивов наибольший интерес представляют CAG, AAT, GGA, AAAG, AATG и GATG в связи с их повышенной встречаемостью в кодирующих последовательностях или в прилежащих к ним областях [33–36]. На основе отобранных локусов микросателлитов сформированы два полиморфных и девять STS-маркеров хромосомы 3 человека.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Скрининг на микросателлиты методами гибридизации проводили с использованием *NotI*-связующих (содержат фрагменты ДНК, прилежащие к одному и тому же *NotI*-участку) и *NotI*-прыжковых (содержат фрагменты ДНК, прилежащие к соседним *NotI*-участкам) клонов, отобранных из соответствующих клонотек хромосомы 3 человека (векторы λ SK17, λ SK22, размер вставок 5–15 т.п.н.) [4, 5]. Использованы 150 клонов (143 связующих и 7 прыжковых), у которых предварительно определены нуклеотидные последовательности, прилежащие к *NotI*-участку (200–600 п.н.), и субрегиональная локализация [8–16].

Для скрининга использованы: контиг 22 космид (570 т.п.н., вектор pWE15), покрывающий область гомозиготных делеций в ДНК из клеток мелкоклоточного рака легкого и относящийся к району 3p21.3 [25]; *NotI*-связующие клонотеки генома человека HL1NB и HL1NR (вектор λ SK17, вставка 5–8 т.п.н.) [37]; клонотека кДНК 8-не-

дельных эмбрионов человека, содержащая амплифицированные с помощью ПЦР 3'-концевые участки кДНК размером 0.2–0.9 т.п.н. в векторе pCDNAII, обогащенная по хромосоме 13 (30% от суммарной кДНК), предоставлена А.В. Белявским и В.М. Захарьевым, Институт молекулярной биологии РАН [38, 39], и кДНК-клонотека печени эмбрионов (фирма "Clontech," #: HL1064a), в векторе λ gt10, содержащая 5'-концевые участки кДНК размером 0.8–4.5 т.п.н.

В качестве зондов на микросателлиты использованы олигонуклеотиды (AAT)₇, (CAG)₇, (CTG)₇, (GGA)₇, (CAC)₇, (AAAG)₅, (AATG)₅, (GATG)₅, (GACT)₅ и (CA)₁₄, которые метили [γ -³²P]ATP полинуклеотидкиназой фага T4. Гибридизацию колоний и блот-гибридизацию проводили в буфере, содержащем 6-кратный SSC, 5-кратный раствор Денхардта, 0.2%-ный додецилсульфат Na и 1×10^6 имп/мин/мл меченого зонда при 37–65°C в течение 2 ч. Фильтры отмывали 2-кратным SSC, содержащим 0.2%-ный додецилсульфат Na, при 37–65°C в гибридизаторе фирмы "Techne". Радиоавтографы получали на рентгеновской пленке PM-B с усиливающим экраном ЭУИ-1.

Фрагменты ДНК космид, *NotI*-связующих и *NotI*-прыжковых клонов субклонировали в *E. coli* JM109 с использованием векторов pUC19 и pUC21 [40]. Компетентные клетки получали с применением полиэтиленгликоля и диметилсульфоксида [41]. Космидные, плазмидные, связующие и прыжковые клоны выращивали в среде LB с добавлением 50 мкг/мл ампициллина. ДНК всех клонов выделяли щелочным методом с последующей обработкой РНКазой А и смесью фенол-хлороформ и пересаждали спиртом [42]. Расщепление ДНК клонов рестриктазами, электрофорез в 0.7–1.0%-ном агарозном геле, перенос фрагментов ДНК на нейлоновые фильтры Hybond N ("Amersham") проводили по стандартным процедурам [35]. Использовали ферментные препараты фирмы "Ферментас" (Литва) в условиях, рекомендованных изготовителем.

Нуклеотидную последовательность клонированных ДНК определяли на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems, используя стандартный набор реактивов "PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit" той же фирмы. Режим ПЦР: 96°C – 10 с, 50°C – 5 с, 60°C – 4 мин (25 циклов).

В компьютерном поиске микросателлитов использованы нуклеотидные последовательности фрагментов ДНК, прилежащих к *NotI*-участкам в клонотеках, отобранных из *NotI*-связующих и *NotI*-прыжковых клонотек хромосомы 3 человека [4, 5]. Коллекция насчитывает около 1000 секвенированных участков ДНК длиной 200–600 п.н. Исследованы также нуклеотидные последовательности кДНК, или EST (expressed sequence tags) и

Таблица 1. Содержание микросателлитов семи мотивов в ДНК 150 *NotI*-связующих и *NotI*-прыжковых клонов хромосомы 3

<i>NotI</i> -клон	Размер вставки, т.п.н.	Локализация, [8-16]	Проба						
			(CTG) ₇	(GGA) ₇	(CAC) ₇	(AAT) ₇	(AAAG) ₅	(AATG) ₅	(GATG) ₅
NL1-212	8.0	3p21.2	-	-	-	-	+, S	+, S	-
NL1-202	7.5	3q13.3	-	-	-	-	+, S	-	-
NL1-210	10.1	3p21.2-21.3	-	-	+, S	-	-	-	-
NL2-249	8.0	3q21	-	-	-	-	+, S	+, S	+, S
NL1-308	14.5	3p21.3-p22	+	-	-	-	-	-	-
NL2-001	11.5	3p25-p26	+	-	+, S	-	-	-	-
NL2-008	15.0	3p14.3-p21.2	-	-	-	+, S	-	-	-
NL1-205	6.0	3q21	-	-	-	-	+	-	-
NL2-209	11.0	3q29	-	-	-	-	+	-	-
NL2-252	11.0	3q29	-	-	-	+, S	+	-	-
NRL-062	5.0	3p25	+	-	-	-	-	-	-
NRL-081	9.0	3q23	-	-	+	-	-	-	-
NRL-114	7.0	3q26.2-26.3	+	-	-	-	-	-	-
NRL-021	7.5	3q27-q28	+	+	-	-	-	-	-
NRL-124	5.0	3q22	-	+	-	-	-	-	-
NLM-199	12.6	3p24.3-p25.2	-	-	-	-	-	+, S	-
NL-026	14.0	3q29	-	-	-	-	+, S	+, S	-
NLM-208	13.5	3q28	-	-	-	-	+, S	+, S	-
NLM-216	9.0	3p21.31-p23	-	-	-	-	+, S	+, S	-
J32-135H	7.3	3p21	-	-	-	+, S	-	-	+, S
NL1-276	6.5	3p25	+	-	-	-	-	-	-
NL1-256	10.0	3p22	+	-	-	-	-	-	-
L2-081	7.5	3p21	+	-	-	-	-	-	-
J32-180	11.1	3p14.3-p21.1	+	-	-	-	-	-	-
Σ			9	2	3	3	9	6	2
CHLC			0	0	0	11	2	3	3

Примечание. +/- -- данные гибридизации колоний; S -- данные гибридизации по Саузерну; Σ -- число клонов, позитивных по данному мотиву; CHLC -- число маркеров хромосомы 3, созданных CHLC на основе данного мотива.

генома человека, содержащиеся в базах данных. Последовательности EST (GenBank, release 95) скринированы на присутствие повторов (CAG)_n и (CTG)_n с числом звеньев не менее пяти. Геномная последовательность суммарной длиной 61389234 п.н. (54600 секвенированных участков со средней длиной 1113 п.н., GenBank, release 97) скринирована на присутствие микросателлитных мотивов AAAG, GAAT, GATG и GACT с числом tandemных повторов не менее шести.

Геномную ДНК человека выделяли из клеток крови с использованием протеиназы К [43].

ПЦР проводили на амплификаторе Techne PHS-2. Реакционная смесь содержала 0.67 М

Трис-НСl, рН 8.8; 167 мМ (NH₄)₂SO₄; 0.01%-ный Твин-20; 0.2 мМ каждого dNTP; 0.1 мкг геномной ДНК; 20 пмолей каждого праймера; 2 ед. акт. полимеразы *Taq*^R, MgCl₂ в концентрации от 1 до 4 мМ. Продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле и в 12%-ном ПААГ, который окрашивали серебром [28]. Наличие полиморфизма выявляли, используя выборку из 15 неродственных индивидов. Аллельный полиморфизм локусов (CAG)_{14/16}, EST04896 и (TG)₂₇ (клон NL1-024) изучали на популяционной выборке из 100 неродственных русских, проживающих в европейской части России.

Локализацию локуса EST04896 определяли с помощью ПЦР-скрининга с использованием двух независимых картирующих панелей соматических клеточных гибридов человек-грызун из 32 и 24 линий [44, 45], любезно предоставленных Е.Д. Свердловым (Институт биоорганической химии РАН, Москва) и Н.К. Спурром (Imperial Cancer Research Fund, Лондон).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Частоты встречаемости микросателлитов в ДНК *NotI*-связующих и прыжковых клонов хромосомы 3 и в космидах из области 3p21.3. Поиск микросателлитов в ДНК хромосомы 3 человека осуществлен с применением двух подходов – компьютерного анализа коллекции нуклеотидных последовательностей, окружающих *NotI*-участки на хромосоме 3 [4, 5], и скрининга панели 150 *NotI*-связующих и *NotI*-прыжковых клонов хромосомы 3 гибридизацией с мечеными олигонуклеотидными пробами. Проведен компьютерный поиск микросателлитов всевозможных мотивов среди нуклеотидных последовательностей, прилежащих к *NotI*-участкам в *NotI*-связующих и *NotI*-прыжковых клонов хромосомы 3. Среди приблизительно 1000 проанализированных последовательностей длиной 200–600 п.н. выявлено около 30 локусов. Согласно этим данным, вблизи *NotI*-участков средний размер фрагментов ДНК, содержащих один локус повторов, составляет ~13 т.п.н. Предполагают [26], что геном человека содержит в сумме около 200000 всевозможных три- и тетра-нуклеотидных повторов, а среднее расстояние между соседними локусами составляет ~15 т.п.н. Следовательно, суммарная частота встречаемости микросателлитов вблизи *NotI*-участков на хромосоме 3 мало отличается от аналогичной величины, рассчитанной для генома человека в целом.

Из 30 локусов, отобранных компьютерным поиском, шесть анализировали с помощью ПЦР-скрининга. Так как исходные клонотекы сконструированы на основе ДНК моносомного клеточного гибрида хромосомы 3 человека и мыши [4, 5], некоторая доля этих локусов принадлежит ДНК мыши. В связи с этим в дальнейших исследованиях использовали коллекцию индивидуальных клонов, локализованных на хромосоме 3 человека несколькими методами [8–16]. ДНК 150 *NotI*-связующих и *NotI*-прыжковых клонов из этой коллекции проверяли на присутствие микросателлитов 9 мотивов (табл. 1). Обращает на себя внимание высокое содержание в этих клонов повторов CAG (9 локусов), характерных для экзонов [34], а также мотивов AAAG (9 локусов) и AATG (6 локусов), встречающихся в 5'-областях многих генов вблизи промоторов и энхансеров [35]. Выявлены три локуса AAT, характерного для интронов [34]. Кроме того, обнаружены три повтора CAC и два – GGA. Найдены также два локуса мотива GATG, который встречается в три раза чаще в теломерной области длинного плеча хромосомы 13, богатой генами [36].

В табл. 2 приведены данные скрининга 22 космид из области 3p21.3 на присутствие микросателлитов семи мотивов. Чаще всего встречаются микросателлиты мотивов AATG, GATG и CAG (4, 3 и 3 повтора соответственно), а также AAT и AAAG (по 1–2 локуса), характерные для областей, содержащих гены [34–36].

С учетом размера области ДНК (примерно 570 т.п.н.), покрытой 22 перекрывающимися космидами из зоны 3p21.3, и количества выявленных локусов каждого мотива рассчитаны средние расстояния между соседними локусами в этом районе хромосомы 3 (табл. 3). Учитывая размер вставки в *NotI*-связующих и прыжковых клонов

Таблица 2. Содержание микросателлитов семи мотивов в ДНК 22 перекрывающихся космид из области 3p21.3

Космида	Проба						
	(CTG) ₇	(GGA) ₇	(CAC) ₇	(AAT) ₇	(AAAG) ₅	(AATG) ₅	(GATG) ₅
2	+	–	–	–	–	–	–
4	+	–	–	–	–	–	+, S
6	–	–	–	–	–	+, S	+, S
7	–	–	–	–	–	+, S	–
8	–	–	–	+, S	–	–	–
9	+	–	–	–	–	–	–
16	–	–	–	–	–	+, S	+, S
17	–	–	–	–	–	+, S	–
20	–	–	–	–	+	–	–
Σ	3	–	–	1	1	4	3

* Обозначения см. табл. 1.

(5–15 т.п.н.), суммарная длина участков ДНК хромосомы 3, содержащихся в 150 клонках, составляет приблизительно 1500 т.п.н. Зная число выявленных локусов каждого мотива, можно рассчитать среднюю длину фрагмента ДНК, содержащего один локус с микросателлитом данного мотива вблизи *NotI*-участков хромосомы 3 (табл. 3). Для мотивов CA и GACT учтены количества выявленных локусов в составе 22 космид (6 и 0 соответственно) и среди 100 *NotI*-связующих клонов (11 и 1 соответственно). Расчет средней длины фрагмента ДНК, содержащего один локус данного мотива, позволил сравнить частоты встречаемости микросателлитов 9 мотивов в исследуемых клонках между собой и определить наиболее представленные мотивы (CA, CAG и AATG). В следующем разделе работы проведено сравнение найденных величин с частотами встречаемости микросателлитов этих мотивов в ДНК клонов других клонотек и в участках генома человека с известной нуклеотидной последовательностью.

Сравнение содержания микросателлитов разных мотивов в ДНК исследованных клонов хромосомы 3, в ДНК клонов других клонотек и в участках генома человека с известной нуклеотидной последовательностью. Для сопоставления содер-

жания CA-повторов и микросателлитов тримерных мотивов (CAG, GGA, AAT и CAC) в клонках хромосомы 3 и в геноме человека в целом использованы данные литературы [3, 33, 34] (табл. 3). Проведен компьютерный поиск тетрамерных повторов AAAG, AATG, GATG и GACT среди нуклеотидных последовательностей генома человека с суммарной длиной 61.4 млн.п.н. (54600 секвенированных участков со средней длиной 1113 п.н., GenBank, release 97). Для мотива AAAG выявлен 131 локус, GATG – 48, GAAT – 19, GACT – 0. На основании этих величин и данных литературы определено среднее расстояние между соседними локусами данного мотива в геноме человека в целом.

Как показывает сопоставление полученных величин (табл. 3), микросателлиты мотивов CAG, AAT, GGA, AAAG, AATG и GATG, распространенные в кодирующих и прилежащих к ним участках, встречаются в ДНК *NotI*-связующих и прыжковых клонов хромосомы 3 и в космидах из области 3p21.3 в 3–10 раз чаще, чем в геноме в целом. Напротив, повторы (CA)_n, которые относятся на 97% к некодирующим областям [46], обнаружены в 3 раза реже ожидаемого. Наиболее наглядно сравнение локусов (CAG)_n, характерных для экзонов [34], и повторов (CA)_n. Если в геноме

Таблица 3. Сравнение частот встречаемости микросателлитов девяти мотивов в ДНК *NotI*-клонов хромосомы 3, в контиге космид из 3p21.3, в ДНК геномных и кДНК-клонотек и в нуклеотидных последовательностях генома человека*

Мотив → Клон. ↓	CA	CAG	GGA	AAT	CAC	AAAG	AATG	GATG	GACT
150 <i>NotI</i> -связующих и <i>NotI</i> -прыжковых клонов хромосомы 3, 5–15 т.п.н. [6–16]	90	170	750	500	500	170	250	750	1000
22 космиды из 3p21.3, ~570 т.п.н. [25]	90	190	570	570	>570	570	140	190	>570
Геном человека	30 [33]	1300 [34] 2000–2500 [3]	3200 [34]	1600 [34]	>16000 [34]	470 GB	3200 GB	1300 GB	>60000 GB
<i>NotI</i> -связующие клонотек генома человека HL1NR, HL1NB, λSK17, 5–8 т.п.н., 5000 клонов [37]	**	**	500	**	**	**	**	1000	**
кДНК-клонотека 3'-концы, 0.2–0.9 т.п.н., 4500 клонов [38, 39]	**	**	400	**	**	**	**	3000	**
кДНК-клонотека, 5'-концы, Clontech, 0.8–4.5 т.п.н., 2000 клонов	**	**	1000	**	**	**	**	3000	**
Космидная клонотека хромосомы 13, 35 т.п.н., 12000 клонов [47, 48]	**	2000	600	**	2000	**	**	1000	1400

* Приведен средний размер участка ДНК, содержащего один локус данного мотива в т.п.н.

** Не исследовано.

GB – GenBank, release 97.

человека локусы (CAG)_n встречаются в 50 раз реже, чем повторы (CA)_n [3], то в ДНК исследованных клонов хромосомы 3 их частоты встречаемости различаются лишь в два раза. Трехкратное уменьшение содержания межгенных СА-повторов и почти десятикратный избыток экзон-специфичных повторов типа CAG свидетельствуют о высоком содержании кодирующих областей в ДНК *NotI*-связующих и прыжковых клонов хромосомы 3 и в космидах из области 3p21.3.

Содержание повторов GGA и GATG исследовано вблизи *NotI*-участков с использованием *NotI*-связующих клонотек генома человека HLN1B и HLN1R [30] и в составе 3'- и 5'-участков генов с использованием двух клонотек кДНК – клонотеки из 8-недельных эмбрионов человека (3'-фланги) [38, 39], и клонотеки фирмы "Clontech" из печени эмбрионов (5'-фланги, табл. 3). Оказалось, что частоты встречаемости тринуклеотида GGA в ДНК *NotI*-связующих клонов и в кДНК близки. Длина участка ДНК, содержащего один локус, составляет 400–1000 т.п.н., что существенно короче, чем в геноме в целом (в среднем 3200 т.п.н.). Как и следовало ожидать, представленность тетрамерного повтора GATG в кДНК гораздо ниже, чем в геноме в целом. В *NotI*-связующих клонах и космидах из области 3p21.3 он обнаруживается несколько чаще, что согласуется с представлением о повышенном содержании повтора GATG и некоторых других тетрамеров в богатых генами областях [35, 36].

Представляет интерес сопоставление полученных данных о частотах встречаемости некоторых мотивов на хромосоме 3 с соответствующими величинами, установленными для акроцентрической хромосомы 13 [47, 48] (табл. 3). Так, характерный для экзонов мотив CAG найден в большом избытке в *NotI*-связующих и прыжковых клонах хромосомы 3 и в космидах из 3p21.3, а в космидах хромосомы 13 он представлен в той же степени, что и в геноме в целом. Найдено повышенное содержание мотивов GGA и CAC и в ис-

следованных клонах хромосомы 3, и в космидах хромосомы 13. Повышенная представленность этих мотивов в хромосоме 13 связана со структурными особенностями акроцентрических хромосом и, по-видимому, определяется кластеризацией микросателлитов ряда мотивов в спейсерных областях генов рРНК [47]. Таким образом, некоторые мотивы специфичны к определенным участкам генома, например, CAG-повторы – к экзонам, тогда как другие могут группироваться в разных областях генома – вблизи структурных генов и в спейсерных областях генов рРНК.

Микросателлиты в *NotI*-связующих и прыжковых клонах как маркеры генов; структура некоторых локусов микросателлитов. Поиск микросателлитов среди 150 *NotI*-связующих и прыжковых клонов хромосомы 3 и 22 космид из области 3p21.3 методом гибридизации колоний позволил отобрать два *NotI*-прыжковых и 22 *NotI*-связующих клон, а также девять космид (табл. 1 и 2). Значительная часть отобранных клонов проверена методом гибридизации по Саузерну (не показано).

Использованные нами *NotI*-связующие и прыжковые клоны содержат вставки ДНК, нуклеотидная последовательность которых вблизи *NotI*-участков известна [4, 5], что позволило сравнить эти последовательности с известными генами и EST [8–16]. Согласно этим данным, последовательности ДНК половин отобранных нами клонов (12 из 24) содержат участки выраженной гомологии с генами. Иными словами, в составе ДНК каждого из этих 12 клонов в пределах 5–15 т.п.н. (размер вставки в клонах) выявлен и локус микросателлита, и участок гомологии с геном.

Например, в ДНК клон NL1-210 найдены протяженная область идентичности с геном протеинкиназы 3pK человека (300 п.н., 100%) [10, 11] и локус (CAC)_n. В ДНК клонов NL2-008, NL2-249 и NL2-252 выявлены участки гомологии с генами EST190353 3'(151 п.н., 93.4%), рибосомного белка

GGATCCTCTG	TGAGTTTGGAG	GCCAGCTTGG	TCCAAAGAGT	40
GAGTTCCAGA	TAGCCAGAGC	TACACAGAGA	AACCCTGTCT	80
CAAAGAAAA	GAAAGAAAGA	AAGAAAGAAA	GAAAGAAAGA	120
AAGAAAGAAA	GAAAGAAAGA	AAGGAGAAAA	GAGAAAAGAA	160
AAGAAAAGAA	AAGAAAAGGG	GAAAGGAAAA	GAGAAAAAAG	200
AAAAGAAAGG	AAGAAGGGGA	ATGGAGGAGA	GAGGGAGGGA	240
AGGAGGGAGA	GAGGGAGGNN	NGGAGGAAGG	GAGGGAAGAA	280
GCCTGCTCTA	AAGCATTGCC	TTCAAAGCAT	GAGGTCTTGA	320
GTTAATCCTA	GGAAGTCACG	TTTACTCCCA	GCACCGGGGA	360
GCTGGAGACA	GGTGGATCTG	AACCACACAC	CCTAGGTTGA	400

Рис. 1. Фрагмент нуклеотидной последовательности клон NLM-216; выделены последовательность микросателлита (жирным шрифтом) и праймеров (курсивом).

Таблица 4. Локусы микросателлитов в нуклеотидных последовательностях ДНК клонов хромосомы 3

Клон	Мотив	Праймер	Длина фрагмента, т.п.н.	Структура локуса	
Космида 6	AATG	U	700	(TTCA) ₆	
		R	800	—	
Космида 7	AATG	U	570	(GATG/CATG) ₆ *	
		R	450	—	
Космида 7	GATG	U	700	(AATC/CATC) ₉ *	
		R	700	—	
Космида 16	AATG	U	550	(GAAT) ₅	
		R	550	(AAT/AAAT) ₈ *	
Космида 16	GATG	U	500	—	
		R	300	—	
NL1-212	AAAG	U	1100	(AAAG) ₁₉	
				(AAG/AAAG/AAAAG) ₁₃ *	
J32-135H	AAT	U	500	(AAT) _{10/13} **	
NLM-216	AAAG	U	400	(AAAG) _{25/33} **	
		AATG	U	700	—
		R	1000	—	
NL-026	AATG	U	1100	—	
		R	900	—	

* Приведены все типы повторов в локусе и указано суммарное число повторов.

** Приведено число повторов основного мотива и суммарное число повторов, включая вырожденные.

U, R – стандартные праймеры.

L5 цыпленка (74 п.н., 73%), белка NCK из клеток меланомы человека (47 п.н., 100%) и рецептора трансферрина человека (237 п.н., 100%) [8,16] и локусы (AAT)_n, (AAAG)_n, (AATG)_n, (GATG)_n. Очевидно, что эти микросателлиты могут быть маркерами соответствующих генов.

NotI-связующие клоны NL1-212, NL-026, NLM-216, *NotI*-прыжковый клон J32-135H и космиды 6, 7 и 16 субклонированы с использованием рестриктаз *Sau3AI/BamHI*. Получены 10 субклонов, позитивных на микросателлиты мотивов AAAG, AATG, GATG и AAT. Отобраны субклоны с размерами вставки от 0.5 до 2.0 т.п.н. Пример нуклеотидной последовательности, содержащей микросателлит, показан на рис. 1. В нуклеотидных последовательностях субклонированных фрагментов космид 6, 7 и 16 общей протяженностью около 6 т.п.н. идентифицированы пять локусов микросателлитов преимущественно несовершенной мозаичной структуры: (CATC/AATC)₉, (AAT/AAAT)₈, (TTCA)₆, (GATG)₆ и (GAAT)₅ с числом повторов от пяти до девяти (табл. 4). В ДНК субклонированных фрагментов *NotI*-связующих клонов NL1-212 и NLM-216, а также *NotI*-прыж-

кового клона J32-135H (около 6 т.п.н.) идентифицированы четыре повтора: локус (AAAG)₁₉ совершенной структуры и локусы (AAAG)_{25/33}, (AAT)_{10/13} и (AAG/AAAG/AAAAG)₁₃, содержащие вырожденные мономеры (табл. 4).

Использование ПЦР для характеристики локусов микросателлитов, идентифицированных в ДНК *NotI*-связующих, *NotI*-прыжковых и космидных клонов. Новые локусы микросателлитов, идентифицированные в ДНК хромосомы 3 путем компьютерного анализа или секвенирования субклонированных фрагментов, исследованы с помощью ПЦР. Праймеры подобраны к наиболее протяженным из них. В табл. 5 приведены названия клонов, структура локусов, праймеры и условия ПЦР. Локусы 1–6 отобраны с помощью компьютерного анализа нуклеотидных последовательностей, окружающих *NotI*-участки в клонах *NotI*-связующих и прыжковых клонотек хромосомы 3 (около 1000 клонов). Так как исходные клонотекы [4, 5] содержали вставки ДНК из генома человека и мыши, то при анализе этих локусов в качестве матрицы использовали ДНК и человека, и мыши. Результаты ПЦР показали, что из

Таблица 5. Анализ локусов микросателлитов, идентифицированных в нуклеотидных последовательностях ДНК клонов хромосомы 3, методом ПЦР

Клон	Структура локуса	Праймер	Режим амплификации, t, °C/время, с	Продукт амплификации ДНК человека, п.н.	Продукт амплификации ДНК мыши, п.н.
LNLP865d	(CTAT) ₁₄	1. 5'-CAGCTCTCCTTGCACGAATG 2. 5'-TAAAGGGCTGCAGGTACACA	94/50 56/50 72/50	147	-
NL2-037d	(CAAA) ₆	1. 5'-GGTCCTTGGTAAAATGGCTT 2. 5'-ACACCAGCTAACCCCTAAT	94/45 56/45 72/45	162	-
NLM-187r	(AGG) _{10/23} *	1. 5'-TTTGGATGACTGAACTCGCA 2. 5'-GGATGCTGCCCTAGAGTTTG	94/45 55/50 72/50	190	-
J32Z-184r	(GCC) ₇	1. 5'-GGCTGTTTACCCGGCTGCAT 2. 5'-TCAGTCACGGCTCCCATGGC	94/50 63/50 72/40	-	270
J32Z-191r	(GCC) ₈	1. 5'-TAGTTAGGGTTCCGCCAGCC 2. 5'-CTGGAAGTTCATGGCTCCGG	94/45 60/45 72/40	-	260
J32Z-013d	(CGG) ₇	1. 5'-GGCGGCTGGAAGTGGCTGTG 2. 5'-CCATCGTCCGTGCTTCTGCC	94/45 62/45 72/40	100	-
NL1-024	(TG) ₂₇	1. 5'-GGGCTGGCAGAACAGGTAACG 2. 5'-GAGGCATCACTGGGTTCGCTG	94/60 62/60 72/60	140-150	-
NL1-212	(AAAG) ₁₉	1. 5'-TGTCACAAAGCCAATGCAGCA 2. 5'-AGGCAGAGGCAGGTGGATTTT	94/60 60/60 72/60	220	-
NLM-216	(AAAG) _{25/33}	1. 5'-TGAGTTCAGATAGCCAGAGC 2. 5'-TTGAAGGCAATGCTTTAGAGC	94/60 58/60 72/60	245	-
Космида 6	(TTCA) ₆	1. 5'-TCAAGTACATGGGAGCACCTC 2. 5'-CCTGGGGTCAAGATTGCAAGA	94/60 58/60 72/60	220	-
Космида 7	(CATC/AATC) ₉	1. 5'-GCGTTCCTGCCCTGTCAACTC 2. 5'-TTCCGCACTGTTCTTCTCCC	94/45 60/45 72/45	240	-
Космида 13	(AT) ₃₁	1. 5'-TGTCACAAAGCCAATGCAGGA 2. 5'-AGGCAGAGGCAGGTGGATTTT	94/45 66/50 72/50	136	-

* Приведено число повторов основного мотива и суммарное число повторов, включая вырожденные.

Таблица 6. CAG/CTG-повторы в кДНК из головного мозга человека

EST	Структура локуса*	Праймер	Режим амплификации, t, °C/время, с	Продукт амплификации, п.н.	Число аллелей
EST04896	(CAG) _{14/16}	5' CTCTCCTGAAAGCTTCTCCC 5' GGCTGGAGCCTTTTNACT	94/60 50/60 72/60	138–153	6
EST06764	(CAG) _{10/24}	5' TCTGAACCAGGCCCTCGC 5' GGCTCCTCCCCGTGGCTA	94/45 58/45 72/45	206	2
EST06822	(CAG) _{14/21}	5' AGCAGCACTACACAGCAGCCT 5' TAGACGAAGATGTTGCAGCCA	94/45 51/30 72/30	181	1
EST04583	(CAG) _{11/13}	5' CAAAAGTGGCACATGCAGAA 5' CCTTTTATTGCATCCATCCA	94/60 53/60 72/30	329	1
EST02676	(CTG) _{9/12}	5' GGCGATTAGGGGTTGTCCGT 5' ATCCTACGATGTGCTGCTGC	94/45 55/45 72/60	310	1
EST05307	(CTG) _{7/8}	5' GCCGCGTCCTCTCCCCAAGT 5' AGGGGTGGTGGCAGCAGCAG	94/60 64/50 72/50	281	1
EST06492	(CTG) _{5/8}	5' GAACCCGCTCCCAGACAGAC 5' GATACTGGTGCCTTCTGCAATTT	94/45 56/45 72/45	214	1
H5AAADDDO	(CTG) _{4/5}	5' TAGTTCATGGTTGCTTGAGGT 5' GGAGCCATCCTCCTTGTTTT	94/45 55/45 72/45	150	1

* Приведено число повторов основного мотива и суммарное число повторов, включая вырожденные.

шесть локусов два принадлежат геному мыши. Локусы 1–3 и 6 (табл. 5) относятся к хромосоме 3 человека. Локусы 7–9 (табл. 5) идентифицированы в нуклеотидных последовательностях клонов, локализованных на хромосоме 3 ранее (NL1-024, NL1-212 и NLM-216); локусы 10–12 выявлены в ДНК субклонов космид 6, 7 и 13.

Таким образом, подобраны праймеры для локусов 1–3 и 6–12 хромосомы 3 человека (табл. 5). Полиморфизм этих локусов исследован с использованием коллекции ДНК неродственных индивидов. Гетерозиготность обнаружена только для локуса (TG)₂₇, содержащегося в последовательностях ДНК клона NL1-024 (число аллелей – 6, наблюдаемая гетерозиготность – 0.73). Для ос-

тальных локусов, в том числе достаточно протяженных (с числом повторов 14, 19, 23, 31 и 33) и с совершенной структурой ((AAAG)₁₉ или (СТАТ)₁₄), гетерозиготность не обнаружена. Низкий полиморфизм локусов микросателлитов вблизи *NotI*-участков (1 из 7) и в космидах из области 3p21.3 (0 из 3) связан, скорее всего, с высоким содержанием в этих районах хромосомы 3 генов, имеющих более консервативную структуру, чем межгенные участки.

Повторы CAG/CTG в последовательностях кДНК. Прямым источником маркеров генов служат микросателлиты, найденные в кДНК [1–3]. EST человека, содержащиеся в базах данных, скринировали на повторы (CAG)_n и (CTG)_n, где n

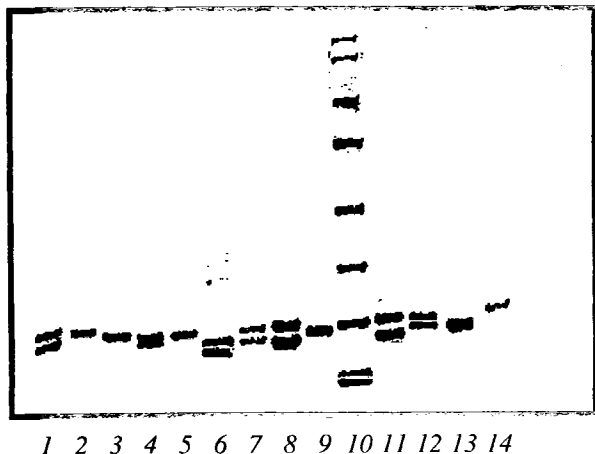


Рис. 2. Электрофорез в 12%-ном полиакриламидном геле продуктов ПЦР локуса $(CAG)_{14/16}$, EST04896. 10 – фрагменты ДНК плазмиды pUC19, гидролизованной рестриктазой MspI. 1–9 и 11–14 – продукты ПЦР 13 индивидов, выявляющие следующие генотипы: 1 – 147/141, 2 – 144, 3 – 144, 4 – 144/141, 5 – 144, 6 – 141/138, 7 – 147/141, 8 – 147/141, 9 – 144, 11 – 150/141, 12 – 150/147, 13 – 147/144, 14 – 150 (размеры аллелей приведены в п.н.).

не менее 5. Отобраны 23 локуса, из которых 12 относятся к кДНК мозга. К восьми наиболее протяженным из них подобраны праймеры, условия ПЦР и исследован полиморфизм с использованием коллекции ДНК неродственных индивидов (табл. 6). Из восьми локусов с числом повторов от 5 до 24 полиморфен лишь локус $(CAG)_8(CGG)_2(CAG)_6$, EST04896 (число аллелей – 6, наблюдаемая гетерозиготность – 0.6). Анализ продуктов ПЦР этого локуса в ПААГ показан на рис. 2. Этот локус имеет совершенную структуру и наибольшее число (14) тандемных повторов основного мотива CAG. Для семи остальных локусов, в том числе довольно протяженных, обнаружены один или два аллеля. Пониженный полиморфизм повторов $(CAG)_n$ отмечен и в других работах. Например, при исследовании гетерозиготности 140 локусов $(CAG)_n$ (при $n > 7$), найденных в геномных клонах, обнаружено 18 локусов с более, чем тремя аллелями [3]. Таким образом, как в кДНК, так и в геномной ДНК человека доля полиморфных локусов среди повторов $(CAG)_n$ примерно одинакова – 1 из 8. Близость этого отношения для геномных нуклеотидных последовательностей и последовательностей кДНК связана, по-видимому, с локализацией локусов $(CAG)_n$ исключительно в экзонах [34]. Так как *NotI*-связующие и прыжковые клоны очень сильно обогащены генами (по данным “нозерн-гибридизации” до 90% [6]; по данным этого исследования – в три и более раз), закономерно, что доля полиморфных локусов в них низка (1 из 7).

Локализацию полиморфного локуса EST04896 исследовали методом ПЦР-скрининга с применением двух независимых картирующих панелей соматических гибридов [44, 45] из 32 и 24 клеточных линий соответственно. В результате этот маркер локализован на хромосоме 3. По данным, полученным с использованием панели делеционных соматических гибридов хромосомы 3 человека и мыши, этот локус скорее всего расположен в области 3p13-p22.

Новые маркеры хромосомы 3 и возможности их применения. Таким образом, с помощью двух подходов – компьютерного поиска и гибридизационного скрининга с последующим субклонированием и определением нуклеотидной последовательности, на хромосоме 3 идентифицирован ряд локусов микросателлитов (табл. 4–6). Эти локусы найдены в последовательностях ДНК космидных, *NotI*-связующих и *NotI*-прыжковых клонов, а также в EST. На основе наиболее протяженных локусов сформированы 11 маркеров, идентифицируемых ПЦР, из которых полиморфны два локуса – $(TG)_{27}$ (клон NL1-024) и $(CAG)_{14/16}$ (EST04896) (табл. 5, 6). Эти локусы локализованы на коротком плече хромосомы 3 в областях 3p21 [15] и 3p13-p22, часто делетируемых при некоторых формах рака [17–24]. Следовательно, новые полиморфные маркеры могут быть использованы для делеционного картирования ДНК опухолей.

Из 11 новых маркеров три STS-маркера относятся к области, влияющей на развитие рака легкого (космиды 6, 7 и 13). Они могут быть использованы для уточнения карты этой области методом ПЦР-скрининга и для локализации на ней потенциальных генов-супрессоров рака.

Четыре других новых маркера хромосомы 3 относятся к генам: полиморфный локус $(CAG)_{14/16}$ (табл. 6) – к гену, экспрессирующемуся в мозге (EST04896); локус $(AAAG)_{19}$ (табл. 5, клон NL1-212) – к гомологам генов аденозилметионин-синтаза человека и крысы (гомология 78.7–87.5%, 164–168 п.н.) и α -субъединицы метионин-аденозилтрансферазы человека (88.5%, 96 п.н.) [14]; локус $(CAAA)_6$ (табл. 5, клон NL2-037) – к гомологу гена рецептора N-метил-D-аспартата крысы (72%, 60 п.н.) [16]; полиморфный локус $(TG)_{27}$ (табл. 5, клон NL1-024) – к гомологу гена рецептора нейропептида Y-Y1 мыши (93.5%, 62 п.н.) [15]. STS-маркеры к генам целесообразно использовать для уточнения локализации генов и совмещения физических, генетических и функциональных карт. Полиморфные маркеры к гену рецептора нейропептида и к гену, экспрессирующемуся в мозге (EST04896), могут также быть использованы при изучении связи этих генов с какими-либо заболеваниями.

Микросателлиты в кодирующих и прилежащих к ним участках, в том числе и мономорфные,

часто подвергаются мутациям типа экспансии тримеров, которые приводят к нейродегенеративным заболеваниям [49–52]. С нестабильностью локусов микросателлитов, выражающейся в изменении числа повторов, связывают и развитие различных неоплазий [53–57]. Возникновение нестабильности микросателлитов объясняют мутациями генов системы репарации [55, 58]. Нестабильность отдельных локусов микросателлитов в ДНК опухоли, а также в ДНК плазмы и сыворотки крови служит основанием неблагоприятного прогноза развития онкологического заболевания [56, 57]. В связи с этим проводят скрининги на микросателлиты в составе генов, а такие гены рассматривают как гены-кандидаты каких-либо заболеваний [3].

Выявленные в данной работе особенности в распределении некоторых микросателлитов указывают на обогащенность генами *NotI*-связующих и *NotI*-прыжковых клонов хромосомы 3 и космид из области, вовлеченной в канцерогенез (3p21.3). Низкий полиморфизм большинства исследованных локусов также частично объясняется их принадлежностью к более консервативным участкам генов.

Авторы благодарят Е.Д. Свердлова (Институт биоорганической химии РАН, Москва) и Н.К. Спурра (Imperial Cancer Research Fund, Лондон) за предоставление панелей соматических клеточных гибридов, В.М. Блинова и Т.В. Лебедеву (НИИМБ, НПО Вектор, Кольцово) за предоставление данных по компьютерному анализу коллекции нуклеотидных последовательностей, прилежащих к *NotI*-участкам в *NotI*-связующих и *NotI*-прыжковых клонх хромосомы 3, А.В. Белявского и В.М. Захарьева (Институт молекулярной биологии РАН, Москва) за предоставление кДНК-клонотеки, содержащей 3'-участки генов.

Эта работа выполнена при поддержке Федеральной подпрограммы Российской Федерации "Геном человека" (проект "Картирование хромосомы 3 человека"), Международной программы Европейского Союза (INTAS-94-4053) и Шведского онкологического общества.

Авторы посвящают эту статью 30-летнему юбилею журнала "Молекулярная биология".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Riggins G.J., Lokey L.K., Chastain J.L., Leiner H.A., Sherman S.L., Wilkinson K.D., Warren S.T. // *Nature Genet.* 1992. V. 2. P. 186–191.
2. Sunden S.L.F., Businga T., Beck J., McClain A., Gastier J.M., Pulido J.C., Yandava C.N., Brody T., Ghazizadeh J., Weber J.L., Duyk G.M., Murray J.C., Buetow K.H., Sheffield V.C. // *Genomics.* 1996. V. 32. P. 15–20.
3. Gastier J.M., Brody T., Pulido J.C., Businga T., Sunden S., Hu X., Maitra S., Buetow K.H., Murray J.C., Sheffield V.C., Boguski M., Duyk G.M., Hudson T.J. // *Genomics.* 1996. V. 32. P. 75–85.
4. Zabarovsky E.R., Boldog F., Thompson T., Scanlon D., Winberg G., Marcsek Z., Erlandsson R., Stanbridge E.J., Klein G., Sumegi J. // *Nucleic Acids Res.* 1990. V. 18. P. 6319–6324.
5. Zabarovsky E.R., Boldog F., Erlandsson R., Allikmets R.L., Kashuba V.L., Marcsek Z., Stanbridge E.J., Sumegi J., Klein G., Winberg G. // *Genomics.* 1991. V. 11. P. 1030–1039.
6. Allikmets R.L., Kashuba V.I., Pettersson B., Gizatullin R., Lebedeva T., Modi W., Bannikov V.M., Kholodnyuk I.D., Petrov N., Zakharyev V.M., Winberg G., Dean M., Uhlen M., Kisselev L.L., Klein G., Zabarovsky E.R. // *Genomics.* 1994. V. 19. P. 303–309.
7. Zabarovsky E.R. // *Molecular biology and biotechnology. A comprehensive desk reference / Ed. Meyers R.A. VCH Publishers Inc., 1995. P. 228–232.*
8. Vorobieva N., Protopopov A., Protopopova M., Kashuba V., Zabarovsky E., Klein G., Kisselev L., Graphodatsky A. // *Cytogenet. Cell Genet.* 1995. V. 68. P. 91–94.
9. Allikmets R., Kashuba V., Modi W., Kisselev L., Dean M., Huebner K., Klein G., Zabarovsky E.R. // *Chromosome Res.* 1996. V. 4. P. 33–37.
10. Sithanandam G., Latif F., Duh F.-M., Bernal R., Smola U., Li H., Kuzmin I., Wixler V., Geil L., Shrestha S., Lloyd P.A., Bader S., Sekido Y., Tartof K.D., Kashuba V.I., Zabarovsky E.R., Dean M., Klein G., Lerman M.I., Minna J.D., Rapp U.R., Allikmets R. // *Mol. Cell. Biol.* 1996. V. 16. P. 868–876.
11. Szeles A., Bajalica S., Lindblom A., Lushnikova T., Kashuba V.I., Imreh S., Nordenskjold M., Klein G., Zabarovsky E.R. // *Chromosome Res.* 1996. V. 4. P. 1–4.
12. Gizatullin R.Z., Protopopov A.I., Zabarovska V., Zakharyev V.M., Kashuba V.I., Klein G., Zabarovsky E.R. // *Cytogenet. Cell Genet.* 1996. V. 74. P. 291–292.
13. Protopopov A.I., Gizatullin R.Z., Vorobieva N.V., Protopopova M.V., Kiss C., Kashuba V.I., Klein G., Kisselev L.L., Graphodatsky A.S., Zabarovsky E.R. // *Chromosome Res.* 1996. V. 4. P. 443–447.
14. Gizatullin R.Z., Kost-Alimova M., Protopopov A., Szeles A., Kashuba V.I., Domninsky D.A., Zakharyev V.M., Graphodatsky A.S., Klein G., Zabarovsky E.R. // В печати.
15. Lushnikova T., Szeles A., Kiss C., Gizatullin R.Z., Kashuba V.I., Kelve M., Zakharyev V.M., Winberg G., Klein G., Zabarovsky E.R. // *Acta Medica Lituanica.* 1997. Suppl. 1. P. 43–47.
16. Fedorova L., Kost-Alimova M., Gizatullin R.G., Alimov A., Zabarovska V., Szeles A., Protopopov A.I., Vorobiova N.V., Kashuba V.I., Klein G., Zelenin A.V., Sheer D., Zabarovsky E.R., // *Eur. J Hum. Genet.* 1997. V. 5. P. 110–116.
17. Yokoyama S., Yamakawa K., Tsuchiya E., Murata M., Skaiyam S., Nakamura Y. // *Cancer Res.* 1992. V. 52. P. 873–877.
18. Hibi K., Takahashi T., Yamakawa K., Ueda R., Sekido Y., Ariyoshi Y., Suyama M., Takagi H., Nakamura Y., Takahashi T. // *Oncogene.* 1992. V. 7. P. 445–449.

19. Van der Berg A., Hulsbeek M.M.F., de Jong D., Kok K., Veldhuis P.M.J.F., Roche J., Buys C.H.C.M. // *Genes Chrom. Cancer*. 1996. V. 15. P. 64–72.
20. Daly M.C., Douglas J.B., Bleehen N.M., Hastleton P., Twentyman P.R., Sundaresan V., Carritt B., Bergh J., Rabbitts P.H. // *Genomics*. 1991. V. 9. P. 113–119.
21. Kok K., van der Berg A., Veldhuis P.M.J.F., van der Veen A.Y., Franke M., Schoenmakers E.F.P.M., van der Ven W., Buys C.H.C.M. // *Cancer Res*. 1994. V. 54. P. 4183–4187.
22. Roche J., Boldog F., Robinson M., Robinson L., Varella-Garcia M., Swanton M., Waggoner B., Fishel R., Franklin W., Gemmill R., Drabkin H. // *Oncogene*. 1996. V. 12. P. 1289–1297.
23. Killary A.M., Wolf M.E., Giamberti T.A., Naylor S.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. V. 89. P. 10877–10881.
24. Todd M.C., Xiang R.H., Garcia D.K., Kerbacher K.E., Moore S.L., Hensel C.H., Lui P., Siciliano M.J., Kok K., van der Berg A., Veldhuis P.M.J.F., Buys C.H.C.M., Killary A.M., Naylor S.L. // *Oncogene*. 1996. V. 13. P. 2387–2396.
25. Wei M.-H., Latif F., Bader S., Kashuba V., Chen J.-Y., Duh F.-M., Sekido Y., Lee Ch.-Ch., Geil L., Kuzmin I., Zabarovsky E., Klein G., Zbar B., Minna J.D., Lerman M.I. // *Cancer Res*. 1996. V. 56. P. 1487–1492.
26. Edwards A., Civitello A., Hammond H.A., Caskey C.T. // *Am. J. Hum. Genet*. 1991. V. 49. P. 746–756.
27. Armour J.A.L., Neumann R., Gobert S., Jeffreys A.J. // *Hum. Mol. Gen*. 1994. V. 3. P. 599–605.
28. Sajantila A., Budowle B., Strom M., Johnsson V., Lukka M., Peltonen L., Ehnholm C. // *Am. J. Hum. Genet*. 1992. V. 50. P. 816–825.
29. Murray J.C., Buetow K.H., Weber J.L., Ludwigsen S., Scherpbier-Heddema T., Manion F., Quillen J., Sheffield V.C., Sunden S., Duyk G.M., Weissenbach J., Gyapay G., Dib C., Morrissette J., Lathrop G.M., Vignal A., White R., Matsunami N., Gerken S., Melis R., Albertsen H., Plaetke R., Odelberg S., Ward D., Dausset J., Cohen D., Cann H. // *Science*. 1994. V. 265. P. 2049–2054.
30. Sheffield V.C., Weber J.L., Buetow K.H., Murray J.C., Even D.A., Wiles K., Gastier J.M., Pulido J.C., Yandava C., Sunden S.L., Mattes G., Businga T., McClain A., Beck J., Scherpiert T., Gilliam J., Zhong J., Duyk M. // *Hum. Mol. Genet*. 1995. V. 4. P. 1837–1843.
31. Gastier J.M., Pulido J.C., Sunden S., Brody T., Buetow K.H., Murray J.C., Weber J.L., Hudson T.J., Sheffield V.C., Duyk G.M. // *Hum. Mol. Genet*. 1995. V. 4. P. 1829–1836.
32. The Utah Development Group. // *Am. J. Hum. Genet*. 1995. V. 57. P. 619–628.
33. Stallings R.L., Ford A.F., Nelson D., Torney D.C., Hildebrand C.E., Moyzis R.K. // *Genomics*. 1991. V. 10. P. 807–815.
34. Stallings R.L. // *Genomics*. 1994. V. 21. P. 116–121.
35. Gonzalez I.L., Sylvester J.E. // *Genomics*. 1995. V. 27. P. 320–328.
36. Иванова Г.М., Чистяков Д.А., Федорова Л.И., Захарьев В.М., Котова Е.Ю., Банников В.М., Кrasilников А.С., Турецкая Р.Л., Ратманова К.И., Вейко В.П., Зеленин А.В., Янковский Н.К., Брага Э.А. // *Молекуляр. биология*. 1997. Т. 31. С. 407–416.
37. Zabarovsky E.R., Allikmets R.L., Kholodnyuk I.D., Zabarovska V.I., Paulsson N., Bannikov V.M., Kashuba V.I., Dean M., Kisselev L.L., Klein G. // *Genomics*. 1994. V. 20. P. 312–316.
38. Koltsova G.T., Kirillov A.V., Bannikov V.M., Belyavsky A.V., Sablina O.V., Vorobieva N.V., Grafo-datsky A.S., Zakharyev V.M. // 2-nd International Chromosome 13 Workshop. Groningen. 1994. P. 13.
39. Yankovsky N.K., Kapanadze B., Baranova A., Koltsova G.I., Braga E.A., Zakharyev V.M. // 2-nd International Chromosome 13 Workshop. Groningen. 1994. P. 27.
40. Yanish-Perron C., Viena J., Messing J. // *Gene*. 1985. V. 33. P. 103–119.
41. Chung C.T., Niemela S.L., Miller R.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989. V. 86. P. 2172–2175.
42. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. // *Molecular cloning: a laboratory manual*. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
43. Grimberg J., Nawoschik S., Belluscio L., McKee R., Turck A., Eisenberg A. // *Nucleic Acids Res*. 1989. V. 17. P. 8390.
44. Копанцев Е.П., Нестерова Т.Б., Бородин А.М., Закиян С.М. // *Генетика*. 1993. Т. 29. С. 40–51.
45. Kelsell D.P., Rooke L., Warne D., Bouzyk M., Cullin L., Cox S., West L., Povey S., Spurr N.K. // *Ann. Hum. Genet*. 1995. V. 59. P. 233–241.
46. Weber J., May P. // *Am. J. Hum. Genet*. 1989. V. 44. P. 388–396.
47. Брага Э.А., Кapanадзе Б.И., Куприянова Н.С., Иванова Г.М., Бродянский В.М., Нечволодов К.К., Шкутов Г.А., Рысков А.П., Носиков В.В., Янковский Н.К. // *Молекуляр. биология*. 1995. Т. 29. С. 1001–1010.
48. Braga E.A., Chistyakov D.A., Ivanova G.M., Nosikov V.V., Kapanadze B.I., Aitova S.S., Kosilova A.V., Sulimova G.E., Yankovsky N.K., Yurov Yu.B., Krasilnikov A.S., Turetskaya R.L., Bannikov V.M., Kost-Alimova M.V., Zelenin A.V. // *Cytogenet. Cell Genet*. 1996. V. 75. P. 105.
49. La Spada A.R., Wilson E.M., Lubahn D.B., Harding A.E., Fischbeck K.H. // *Nature*. 1991. V. 352. P. 77–79.
50. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. // *Cell*. 1993. V. 72. P. 971–983.
51. Willems P.J. // *Nature Genet*. 1994. V. 8. P. 213–215.
52. Chong S.S., McCall A.E., Cota J., Subramony S.H., Orr H.T., Hughes M.R., Zoghbi H.Y. // *Nature Genet*. 1995. V. 10. P. 344–350.
53. Ionov Y., Peinado M.A., Malkhosyan S., Shibata D., Perucho M. // *Nature*. 1993. V. 363. P. 558–561.
54. Thibodeau S.N., Bren G., Schaid D. // *Science*. 1993. V. 260. P. 816–819.
55. Paulson T.G., Wright F.A., Parker B.A., Russack V., Wahl G.M. // *Cancer Res*. 1996. V. 56. P. 4021–4026.
56. Chen X., Stroun M., Magnenat J.-L., Nicod L.P., Kurt A.-M., Lyautey J., Lederrey Ch., Anker Ph. // *Nature Medicine*. 1996. V. 2. P. 1033–1035.
57. Brentnall T.A., Chen R., Lee J.G., Kimmey M.B., Bronner M.P., Haggitt R.C., Kowdley K.V., Hecker L.M., Byrd D.R. // *Cancer Res*. 1995. V. 55. P. 4264–4267.
58. Karran P. // *Science*. 1995. V. 268. P. 1857–1858.