На правах рукописи

ТРИФОНОВА

Екатерина Александровна

СТРУКТУРА НЕРАВНОВЕСИЯ ПО СЦЕПЛЕНИЮ ГЕНА *MTHFR* В ПОПУЛЯЦИЯХ СЕВЕРНОЙ ЕВРАЗИИ И У БОЛЬНЫХ КОРОНАРНЫМ АТЕРОСКЛЕРОЗОМ

03.00.15 - генетика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Томск – 2009

Работа выполнена в Учреждении Российской академии медицинских наук Научно-исследовательском институте медицинской генетики Сибирского отделения РАМН, г. Томск

Научные руководители: доктор биологических наук
Степанов Вадим Анатольевич

академик РАМН, профессор,
доктор медицинских наук
Пузырев Валерий Павлович

Официальные оппоненты: академик РАМН, профессор,
доктор медицинских наук
Коненков Владимир Иосифович

кандидат медицинских наук
Рудко Алексей Анатольевич

Ведущая организация: Государственное образовательное учреждение Высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Защита состоится «___» декабря 2009 года в ____ час. на заседании диссертационного совета ДМ 001.045.01 при Учреждении Российской академии медицинских наук НИИ медицинской генетики Сибирского отделения РАМН по адресу: 634050, г. Томск, ул. Набережная р. Ушайки, д. 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии медицинских наук НИИ медицинской генетики Сибирского отделения РАМН (634050, г. Томск, ул. Набережная р. Ушайки, д. 10).

Автореферат разослан «_____» _____ 2009 года

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук Кучер А.Н.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Генетическая вариабельность составляет основу фенотипической изменчивости человека и имеет огромное значение для объяснения индивидуальных различий в подверженности к мультифакториальным заболеваниям (МФЗ) и определения метаболических путей, вовлеченных в прогрессирование патологического процесса. Наиболее распространенным типом вариабельности генома являются однонуклеотидные замены (SNPs). Усилиями международного консорциума по SNP к настоящему моменту в геноме человека выявлено около 10 миллионов SNPs с плотностью приблизительно 1 полиморфизм на 300 п.н. [Altshuler et al., 2008]. Каждый новый аллель SNP возникает на фоне уже существующего гаплотипа, с аллелями, составляющими который, он изначально ассоциирован. Совместное наследование аллелей в гаплотипе на популяционном уровне проявляется как неравновесие по сцеплению (LD). Предполагается, что характеристика структуры LD позволит реконструировать демографическую историю популяций и займет центральное место при картировании генов МФЗ [Jeffreys et al., 2001; Gabriel et al., 2002; Slatkin, 2008].

В данной работе в качестве локуса для изучения неравновесия по сцеплению в популяциях был выбран ген метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*), являющейся катализатором единственной внутриклеточной реакции образования 5-метилтетрагидрофолата, который необходим для восстановления гомоцистеина до метионина. Снижение активности данного энзима, часто обусловленное мутациями в гене *MTHFR*, приводит к накоплению гомоцистеина (ГЦ) и развитию умеренной гипергомоцистеинемии (ГГЦ).

Согласно результатам проспективных когортных исследований (Physicians Health Study, British United Provident Study, Tromso Study и British Regional Heart Study) высокий уровень ГЦ в крови увеличивает риск атеросклероза, ишемических нарушений и болезни Альцгеймера, а частота выявления ГГЦ составляет около 5% в общей популяции и достигает 13-47% среди пациентов с ССЗ [Nygard et al., 1995; Дербенева и др., 2003; Libby et al., 2005; Верткин и др., 2007].

Стенозирующий атеросклероз и последующая эмболизация сосудистого русла, сопровождаемая ишемией тканей, является ведущей причиной заболеваемости и смертности населения экономически развитых стран [Nabel, 2003; Торшин, 2008]. Данные многочисленных эпидемиологических, семейных и близнецовых исследований, полногеномного картирования свидетельствуют о значительном вкладе наследственности в этиологию и патогенез этого МФЗ [Herrmann et al., 2002; Zieske et al., 2002; Воевода и др., 2006; Пузырев, 2009].

Выявление структуры генетической компоненты распространенных болезней является одним из ключевых направлений в современной генетике человека. Эффекты отдельных полиморфизмов, выявляемые при классическом анализе ассоциаций, как правило, невелики и могут быть связаны не с самим изучаемым маркером, а со сцепленным с ним функционально значимым вариантом [Altshuler et al., 2008]. В силу этого анализ ассоциаций на уровне гаплотипов и их tagSNPs может оказаться более мощным и информативным средством, чем изучение отдельных маркеров [Collins et al., 2004; Crawford et al., 2005; Wollstein et al., 2007; Petterson, 2009]. Поскольку характер LD в современных

популяциях человека является результатом комплексного эволюционного процесса, который включает как демографическую историю популяций, так и гено-специфические факторы, то маловероятно, что характер LD, выявленный в конкретной популяции или выборке может быть автоматически распространен на другие популяции, по крайней мере, в некоторых участках генома [Reich et al., 2001; Shifman et al., 2003; Liu et al., 2004; Oota et al., 2005].

Таким образом, работа, выполненная в рамках изучения характера LD в области генов-кандидатов и обнаружение связанных с болезнью гаплотипов и их tag-меток в конкретных популяционных группах, является высокопродуктивным подходом, позволяющим идентифицировать функциональные варианты, лежащие в основе предрасположенности к коронарному атеросклерозу (КА).

Цель исследования: выявление структуры гаплотипов и неравновесия по сцеплению в гене *MTHFR* у населения Северной Евразии и ее особенностей у больных коронарным атеросклерозом.

Задачи исследования:

1. Оценить вариабельность локуса *MTHFR* на уровне частот генотипов и гаплотипов в популяциях Северной Евразии.
2. Охарактеризовать структуру неравновесия по сцеплению гена *MTHFR* в популяциях Северной Евразии.
3. Идентифицировать информативные маркеры (tagSNPs), описывающие структуру гаплотипов в гене *MTHFR*.
4. Провести анализ ассоциаций полиморфизмов и гаплотипов гена *MTHFR* с атеросклерозом коронарных артерий.
5. Описать характер неравновесия по сцеплению в гене *MTHFR* у больных коронарным атеросклерозом.
6. Провести анализ ассоциаций исследованных SNPs гена *MTHFR* с патогенетически значимыми количественными признаками.

Научная новизна исследования: В результате выполнения работы в популяциях Северной Евразии впервые охарактеризовано генетическое разнообразие локуса *MTHFR* по 12 полиморфным вариантам. Показано, что структура LD в гене *MTHFR* носит популяционно-специфичный характер. Произведена оценка возраста генерации разнообразия по 12 исследованным SNPs гена *MTHFR*, составившая 314000 ± 135000 лет. Выявлена эволюция гаплотипов и их роль при формировании КА в русской популяции. Идентифицированы tagSNPs гена *MTHFR*, показана корреляция вариабельности структуры LD и уровня гаплотипического разнообразия гена *MTHFR* с количеством tagSNPs. Впервые выявлена ассоциация полиморфизмов rs7533315 и rs2066462 с КА. Получены данные о взаимосвязи генетической вариабельности локуса *MTHFR* у больных КА с патогенетически значимыми показателями липидного обмена. Продемонстрирована высокая информативность гаплотипического подхода в анализе ассоциаций с МФЗ методом случай – контроль.

Практическая значимость: Полученные в работе данные могут быть использованы в эволюционной генетике для анализа структуры генофондов мирового народонаселения и создания геногеографических карт. Информация об идентифицированных tagSNPs гена *MTHFR* может служить основой при

планировании дальнейших работ по выявлению генетической предрасположенности к КА и другим заболеваниям, в этиопатогенез которых вовлечен исследованный локус. Сведения о вкладе полиморфизма изученных генетических маркеров в формирование вариабельности подверженности к КА могут быть учтены при формировании групп риска и организации профилактических мероприятий.

Положения, выдвигаемые на защиту:

1. Структура LD в гене *MTHFR* носит популяционно-специфичный характер. Сильное сцепление между исследованными локусами обнаружено в популяциях кетов, южных киргизов и бурят. Популяции русских, хантов и северных киргизов характеризуются средним уровнем LD среди всех исследованных групп. Максимальное количество гаплотипических блоков и слабое сцепление наблюдается в популяциях тувинцев и якутов. Проведенный филогенетический анализ гаплотипов и идентичность основных гаплотипов во всех исследованных выборках свидетельствуют об общем механизме формирования данных паттернов LD.
2. Вариабельность структуры LD и уровень гаплотипического разнообразия гена *MTHFR* в исследованных выборках обуславливают определенный набор tagSNPs с установленной прогностической значимостью для каждой популяции. Наиболее информативно ценными tagSNPs из исследованного массива данных являются rs4846052, rs1801133, rs6541003, rs7533315, rs1801131 и rs3753588.
3. Полиморфизмы rs7533315 и rs2066462 и гаплотип GCCTTCGCACGC гена *MTHFR* являются структурными элементами наследственной компоненты подверженности к КА у русских г. Томска, а гаплотип GCCCTCGCCCGC проявляет протективный эффект. Характер структуры LD в группе пациентов с КА и контрольной выборке имеет во многом схожие черты.
4. У пациентов с КА генотипы шести SNPs (rs7533315, rs6541003, rs2066462, rs1801131, rs17375901, rs1537516) коррелируют с вариабельностью содержания в плазме общего холестерина и/или триглицеридов, с уровнем липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) ассоциированы два полиморфных варианта (rs7533315 и rs2066462). Физиологический механизм подверженности к КА у носителей неблагоприятного гаплотипа 3′-концевого блока сцепления реализуется через нарушения липидного обмена.

Апробация работы: Основные материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на Российской научно-практической конференции «Здоровье девочки, девушки, женщины» (Томск, 2006), VIII научной конференции «Генетика человека и патология» (Томск, 2007); VIII конгрессе молодых ученых и специалистов (Томск, 2007); межлабораторном научном семинаре Учреждения РАМН НИИ медицинской генетики СО РАМН (Томск, 2009).

Публикации: По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 5 в журналах перечня ВАК, рекомендованных для защиты по медицине.

Структура и объем диссертации: Диссертационная работа изложена на 162 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения,

заключения и выводов. Данные проиллюстрированы 16 таблицами и 24 рисунками. Библиографический указатель включает 247 источников, из них 45 работ отечественных авторов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследования послужили образцы ДНК 9 популяционных выборок, проживающих в регионах Северной Евразии (табл. 2), принадлежащих к 7 этническим группам и 4 языковым семьям (алтайской, палеоазиатской, уральской и индоевропейской). Общая численность обследованных индивидов составила 978 человек. Кроме того, в качестве объекта для популяционных сравнений были использованы данные по популяциям европеоидов (штат Юта), китайцев (г. Пекин), японцев (г. Токио) и йоруба (Ибадан), полученные в ходе реализации проекта HapMap [The International HapMap Consortium, 2003].

В рамках данной работы также были обследованы пациенты с КА и контрольная выборка. В группу больных вошли неродственные индивиды европеоидной национальности (128 мужчин и 13 женщин в возрасте от 30 до 70 лет) с атеросклерозом коронарных артерий, наблюдавшихся в отделениях неотложной кардиологии, реабилитации, хронической ишемической болезни сердца и атеросклероза НИИ кардиологии СО РАМН (директор-академик РАМН Р.С. Карпов). Наличие стенозирующего процесса в коронарных артериях было подтверждено ангиографическим обследованием. Контрольную группу составили 126 неродственных индивида европеоидной национальности (123 мужчины и 3 женщины в возрасте от 20 до 58 лет), которые не имели клинических появлений сердечно-сосудистых нарушений. Данная выборка была сформирована в ходе эпидемиологических исследований факторов риска развития ИБС в г. Томске, проводимом в НИИМГ СО РАМН. В контрольной группе и у больных КА были проанализированы следующие количественные признаки: содержание общего холестерина (ОХ), липопротеинов высокой и низкой плотности (ЛПВП и ЛПНП) и триглицеридов (ТГ) в плазме крови, систолическое (САД) и диастолическое (ДАД) артериальное давление, антропометрические показатели.

В качестве маркеров для изучения LD были выбраны 12 SNPs гена *MTHFR* (табл. 1), относительно равномерно охватывающие все участки гена (экзоны, интроны, 3′-нетранслируемый участок), частота минорного аллеля (MAF) для большинства исследованных локусов составляет не менее 5% (по данным базы NSBI). Генотипирование проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Для локусов rs1801131 и rs1801133 использовались описанные в литературе праймеры и рестрктазы [Frosst et al., 1995; van der Put et al., 1996]. Для остальных SNPs условия генотипирования были подобраны в данной работе.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью пакетов статистических программ «Statistica 7.0», «ARLEQUIN» и «Haploview 4.0». Различие двух сравниваемых величин считалось достоверным при достижении уровня значимости $p<0,05$.

Таблица 1

Характеристика исследованных SNPs гена *MTHFR* (по данным базы NSBI)

№	SNPs	dbSNP allele	Тип мутации	Локализация в гене
1	rs3753588	A/**G**		1 интрон
2	rs2066470	**C**/T	Синонимичная (39 Pro/Pro)	2 экзон
3	rs17037397	A/**C**		2 интрон
4	rs7533315	**C**/T		3 интрон
5	rs4846052	C/**T**		4 интрон
6	rs1801133	**C**/T	Несинонимичная (222 Val/Ala)	5 экзон
7	rs6541003	A/**G**		5 интрон
8	rs2066462	**C**/T	Синонимичная (352 Ser/Ser)	7 экзон
9	rs1801131	**A**/C	Несинонимичная (429 Ala/Glu)	8 экзон
10	rs17375901	**C**/T		9 интрон
11	rs2274976	A/**G**	Несинонимичная (594 Gln/Arg)	12 экзон
12	rs1537516	C/T		12 экзон (3'UTR)

Примечание: жирным шрифтом выделен предковый аллель

Для определения характера распределения полученных данных использовали критерий Колмогорова-Смирнова. При проведении попарного сравнения частот аллелей, генотипов и гаплотипов, между анализируемыми группами использовали критерий χ^2 с поправкой Йейтса. При сравнении количественных показателей применялся непараметрический критерий Манна – Уитни. Роль генотипов изучаемых полиморфных вариантов гена в вариабельности количественных признаков определяли с помощью критерия Крускала-Уоллиса [Гланц, 1999]. В исследуемых группах для SNPs вычисляли отношение шансов (OR) и доверительные интервалы (CI) для отношения шансов (95% CI). Соответствие распределения частот аллелей и генотипов равновесию Харди-Вайнберга проверяли по критерию χ^2 [Вейр, 1995]. Частоты гаплотипов определялись с помощью EM-алгоритма. LD между парами SNPs оценивалось с помощью коэффициента D', предложенного Левонтином и коэффициента корреляции r^2 Пирсона. Блочная структура определялась посредством алгоритма «Solid spine LD» [Barret et al, 2005], с заданным порогом $D' \geq 0{,}75$. Уровень генетического разнообразия и межпопуляционной дифференциации вычисляли методом анализа молекулярной вариабельности (AMOVA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Генетическое разнообразие, структура гаплотипов и неравновесия по сцеплению гена *MTHFR* в некоторых популяциях Евразии

Распределение генотипов и частоты аллелей исследованных SNPs гена *MTHFR* приведены в таблице 2. Все 12 локусов оказались полиморфными практически во всех изученных популяциях (за исключением rs2066470 в популяции кетов). Частота минорного аллеля варьировала от 0 до 39%, семь SNPs (rs3753588, rs7533315, rs4846052, rs1801133, rs6541003, rs1801131 и rs1537516) встречались с частотой более 5% во всех популяциях. Полученные данные находятся в пределах вариаций частот аллелей и генотипов SNP гена *MTHFR*, представленных в литературе для европеоидных и монголоидных популяций.

Практически по всем маркерам во всех популяциях распределение частот генотипов соответствует равновесию Харди-Вайнберга (исключение составляют локусы rs17375901, rs2066470, rs3753588, rs2274976 и rs1537516 в популяции бурятов из пос. Хуромша, а также маркеры rs4846052 и rs6541003 в группе больных КА). Наблюдаемое в данном исследовании отклонение от равновесия Харди-Вайнберга может быть обусловлено действием случайных факторов или отражать специфику популяционно-генетических процессов в популяции [Хедрик, 2003].

Таблица 2

Распределение генотипов и минорных аллелей изученных полиморфных вариантов гена *MTHFR* в исследованных выборках

SNPs гена *MTHFR*	Генотип, аллель	Частота, %								
		Тувинцы, (N=134)	Киргизы южные, (N=111)	Киргизы северные, (N=85)	Кеты, (N=38)	Буряты Улан-Удэ, (N=60)	Буряты Хуромша, (N=60)	Якуты, (N=81)	Ханты, (N=142)	Русские (N=126)
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
rs3753588	AA	2	1	1	-	-	3	4	2	1
	AG	13	14	22	11	17	5	20	28	18
	GG	85	85	77	89	83	92	76	70	81
	A	8	8	12	5	8	6	14	16	10
rs2066470	CC	90	85	78	100	83	92	76	79	83
	CT	10	14	18	-	17	5	19	19	16
	TT	-	1	1	-	-	3	5	2	1
	T	5	8	10	-	8	6	14	11	9
rs17037397	AA	-	-	-	-	-	-	3	-	-
	AC	12	11	8	16	20	5	17	26	11
	CC	88	89	92	84	80	95	80	74	89
	A	6	5	4	8	10	3	11	13	6
rs7533315	CC	55	69	60	68	78	63	63	75	53
	CT	38	29	39	29	19	35	37	23	42
	TT	7	2	1	3	3	2	-	2	5
	T	26	16	21	17	13	19	18	13	26
rs4846052	CC	46	55	40	55	58	58	40	51	30
	CT	41	42	52	39	36	35	53	39	53
	TT	13	3	8	6	6	7	7	10	17
	T	34	24	34	25	23	24	34	29	43
rs1801133	CC	67	53	53	79	72	55	61	67	50
	CT	28	37	44	18	25	42	33	29	37
	TT	5	10	3	3	3	3	6	4	13
	T	19	28	24	12	16	24	23	18	31
rs6541003	AA	43	54	38	53	60	58	37	49	29
	AG	46	43	52	42	35	35	52	40	56
	GG	11	3	10	5	5	7	11	11	15
	G	34	24	36	26	23	24	32	31	43

Окончание таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
rs2066462	CC	94	88	93	89	97	97	89	74	94
	CT	6	12	7	11	3	3	11	26	6
	TT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T	3	6	3	5	2	2	6	13	3
rs1801131	AA	44	62	34	58	60	58	46	51	40
	AC	35	35	54	37	36	35	48	38	48
	CC	21	3	12	5	4	7	6	11	12
	C	38	20	39	24	21	24	30	30	36
rs17375901	CC	98	96	89	97	98	94	94	94	91
	CT	2	4	11	3	2	3	6	6	9
	TT	-	-	-	-	-	3	-	-	
	T	1	2	5	1	1	5	3	3	4
rs2274976	AA	-	-	-	-	-	3	3	1	-
	AG	10	30	11	8	17	4	17	23	13
	GG	90	70	89	92	83	93	80	76	87
	A	5	15	5	4	8	5	13	13	6
rs1537516	CC	84	85	80	89	83	92	80	69	82
	CT	16	14	20	11	17	5	17	29	17
	TT	-	1	-	-	-	3	3	2	1
	T	8	8	10	5	8	6	13	16	10
Число найденных гаплотипов		47	27	40	11	17	13	37	40	35
Гаплотипическое разнобразие		0,82	0,62	0,77	0,49	0,59	0,55	0,72	0,78	0,69

Примечание: N – количество индивидуумов в выборке

В исследованных выборках обнаружено 160 гаплотипов из 4096 возможных. Максимальное число гаплотипов выявлено в популяции тувинцев (47), минимальное – в выборке кетов (11). Большинство из исследованных выборок характеризовалось высоким уровнем гаплотипического разнообразия, за исключением кетов, бурят и южных киргизов (Табл. 2). Гаплотипы, встречающиеся с частотой менее 0,5 % в одной популяции, были исключены из анализа. Гаплотипы с частотой более 5 % обозначены как основные гаплотипы. Во всех обследованных популяциях, за исключением русских, наблюдалось 3 основных гаплотипа - GCCCCCACACGC, GCCCCTACACGC, GCCTTCGCCCGC, частоты которых в сумме составляют более 83 % наблюдаемых хромосом в популяциях кетов и бурят, более 61 % в остальных выборках. В данной работе обнаружена различная степень гаплотипического разнообразия в исследованных популяциях, тем не менее, во всех выборках наблюдались одинаковые основные гаплотипы, что указывает на возможность общего механизма формирования данных паттернов LD.

На рисунке 1 показана структура LD между исследованными локусами гена *MTHFR* в 13 популяционных выборках. У русских и хантов выявлены 3 блока. У северных киргизов обнаружено два блока: первый включает три SNPs (rs2066470,

rs17037397, и rs7533315), второй охватывает участок гена в 10 т.п.о. и содержит 8 SNPs. У южных киргизов и кетов все исследованные SNPs находятся в тесном сцеплении и входят в состав одного блока. Сильное сцепление между первыми девятью SNPs, составляющими первый блок размером 9 т.п.о., и между rs2274976 и rs1537516, образующими второй небольшой блок, выявлено у бурятов пос. Хуромша. В популяции бурятов г.Улан-Удэ также выявлено значительное сцепление между многими полиморфными вариантами, но структура LD в этой популяции характеризуется наличием трех блоков. В популяциях тувинцев и якутов можно выделить четыре небольших гаплотипических блок, состоящих из двух или трех соседних SNPs. Гаплотипические блоки длиной от 847 п.о. до 16 т.п.о. представлены несколькими (3-6) основными гаплотипами, которые в сумме составляют более 90% наблюдаемых хромосом. Примечательно, что функционально значимые полиморфизмы C677T и A1298C во всех популяциях, кроме южных киргизов и кетов не сцеплены.

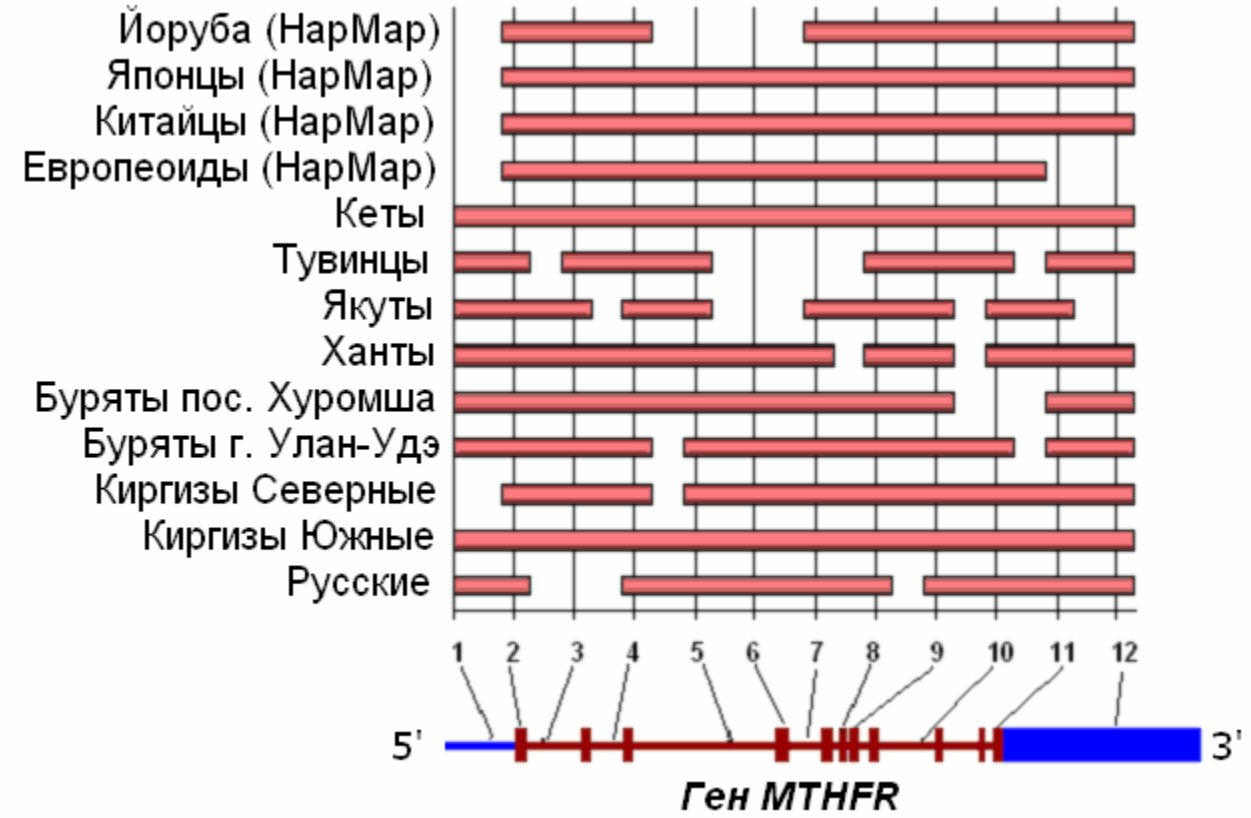

Рис. 1. Гаплотипические блоки в исследованных популяциях. Нумерация SNPs: 1 - rs3753588, 2 - rs2066470, 3 - rs17037397, 4 - rs7533315, 5 - rs4846052, 6 - rs1801133, 7 - rs6541003, 8 - rs2066462, 9 - rs1801131, 10 - rs17375901, 11 - rs2274976, 12 - rs1537516.

Тесное сцепление между исследованными SNPs также было выявлено в популяциях из проекта HapMap. У китайцев и японцев все полиморфизмы входят в состав одного блока, у европеоидов также обнаружен один гаплотипический блок, включающий девять SNPs. В популяции йоруба наблюдалось два блока:

первый - размером 2 т.п.о. и второй достаточно протяженный блок (8) состоящий из 6 локусов (Рис. 1).

В данной работе получено подтверждение популяционно-специфического характера формирования паттернов LD. Наиболее сильное сцепление (все SNPs входят в состав одного блока) между исследованными локусами обнаружено в популяциях кетов, южных киргизов, китайцев и японцев. Тесное сцепление наблюдалось также у бурят. Возможно два объяснения наблюдаемому сохранению структуры и протяженности блока: недавнее происхождение от общих предков или позитивный отбор, который часто приводит к увеличению размера блока, содержащего полезный аллель [Zang, 2006]. Поскольку у кетов и бурят выявлено минимальное число гаплотипов среди всех исследованных популяций, есть вероятность, что в данном случае имел место эффект основателя. Однако на увеличение структуры LD влияет и ряд других факторов [Oraguzie, 2006, De La Vega, 2008] (генетическая изоляция, подразделенность или смешение популяций, балансирующий отбор, эффект «горлышка бутылки», небольшой размер популяции и другие причины), действие которых на некоторые популяции также нельзя исключить.

Показано, что протяженность паттернов LD в геноме человека определяет потенциал и дизайн ассоциативных исследований, использующих SNPs для картирования генов, лежащих в основе комплексных признаков. Текущая оценка числа маркеров, необходимых для LD-базирующего геномного сканирования различных популяций варьирует от 120000 до нескольких миллионов SNPs, свидетельствует об огромной стоимости генотипирования и возможных проблемах статистических выводов. Предполагается, что в популяциях с высокой степенью LD количество маркеров, необходимых для картирования МФЗ, существенно снизится [Service et al., 2007].

Выбор tagSNPs гена *MTHFR*

По оценкам различных исследователей геном человека содержит более 5 миллионов распространенных SNPs с MAF не менее 10% и более 7,5 миллионов распространенных SNPs с MAF более 5% [Carlson et al., 2003; Gonzalez-Neira et al.,2006], которые объясняют часть наследственного риска развития многих МФЗ. Исходя из несомненной потенциальной пользы выбора tagSNPs для ассоциативных исследований, ряд авторов предлагает эффективно идентифицировать tagSNPs посредством различных алгоритмов [Carlson et al., 2004; Wang et al., 2003]. Одним из методов, использованных при определении TagSNPs гена *MTHFR* в данном исследовании, был алгоритм «STAMPA» [Halperin et al., 2005], предусмотренный программным обеспечением «GEVALT» (Табл. 3). Исходя из данных результатов, можно выделить ряд наиболее информативно ценных полиморфных маркеров. Например, rs4846052 является tagSNP во всех исследованных группах, а rs1801133, rs6541003, rs7533315, rs1801131 и rs3753588 присутствуют в качестве tag-меток во многих популяциях.

Таблица 3

Набор TagSNPs гена *MTHFR* с точностью прогноза не менее 95%, установленный посредством алгоритма «STAMPA»

Исследованные популяции	Количество tagSNPs	SNPs гена *MTHFR*											
Русские	6	**1**	2	3	**4**	**5**	**6**	**7**	8	**9**	10	11	12
Северные киргизы	6	**1**	2	3	4	**5**	**6**	**7**	8	**9**	10	11	**12**
Южные киргизы	4	**1**	2	3	**4**	**5**	**6**	7	8	9	10	11	12
Тувинцы	5	**1**	2	3	4	**5**	**6**	**7**	8	**9**	10	11	12
Кеты	2	**1**	2	3	4	**5**	6	7	8	9	10	11	12
Ханты	7	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	9	10	11	12
Якуты	7	**1**	2	3	**4**	**5**	**6**	**7**	8	**9**	10	11	**12**
Буряты г. Улан-Удэ	2	1	**2**	3	4	**5**	6	7	8	9	10	11	12
Буряты пос. Хуромша	2	1	2	3	**4**	**5**	6	7	8	9	10	11	12

Примечание: в таблицах 3 и 4 использована следующая нумерация SNPs - 1 - rs3753588, 2 - rs2066470, 3 - rs17037397, 4 - rs7533315, 5 - rs4846052, 6 - rs1801133, 7 - rs6541003, 8 - rs2066462, 9 - rs1801131, 10 - rs17375901, 11 - rs2274976, 12 - rs1537516. Жирным шрифтом выделены tagSNPs.

Также в данной работе tagSNPs определялись посредством алгоритма «Aggressive tagging» метода «Tagger» программного обеспечения «HaploView». Tag SNPs, выявленные посредством вышеописанного алгоритма в исследованных популяциях представлены в таблице 4. Предсказательная способность данного набора tag-меток относительно всего массива исследованных полиморфизмов составляет 100%.

Таблица 4

TagSNPs гена *MTHFR*, вычисленные в программе «Tagger»

Исследованные популяции	Количество tagSNPs	SNPs гена *MTHFR*											
Русские	9	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	7	**8**	**9**	**10**	**11**	12
Северные киргизы	11	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	7	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Южные киргизы	8	1	**2**	**3**	**4**	5	**6**	7	**8**	**9**	**10**	**11**	12
Тувинцы	11	**1**	**2**	3	**4**	**5**	**6**	7	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Кеты	8	1	2	**3**	**4**	5	**6**	7	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Ханты	9	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	7	**8**	**9**	**10**	**11**	12
Якуты	10	1	**2**	**3**	**4**	5	**6**	7	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
Буряты г. Улан-Удэ	8	**1**	2	**3**	**4**	**5**	**6**	7	**8**	9	**10**	**11**	12
Буряты пос. Хуромша	7	**1**	2	**3**	**4**	5	**6**	7	**8**	**9**	**10**	11	12

Согласно приведенным данным, в различных популяциях наблюдаются неодинаковые наборы tagSNPs, обладающие различной прогностической значимостью, что, вероятно, обусловлено варьированием структуры LD и гаплотипического разнообразия в исследованных выборках. Подтверждением этого служит обнаруженная достоверная корреляция гаплотипического разнообразия и вариабельности количества tagSNPs ($r2=0,85$; $p<0,01$). Показано также, что качество выбранных tagSNPs зависит от исходного массива, в котором

они охарактеризованы. Необходимая плотность маркеров в исходном массиве данных варьирует в различных участках генома в зависимости от ряда показателей, таких, например, как уровень рекомбинации, частоты SNPs, характер мутации и демографическая история населения [Zang, 2007].

Филогенетический анализ взаимоотношений гаплотипов локуса *MTHFR* и оценка селективной нейтральности исследованных SNPs

В данном исследовании филогенетический анализ взаимоотношений гаплотипов, определяемых по диаллельным маркерам и встречающихся с частотой более 1% в тотальной выборке, проводили, конструируя филогенетические деревья (сети) гаплотипов по алгоритму медианных сетей [Bandelt et al., 1999], реализованному в программе «Network». В качестве предкового гаплотипа рассматривали гаплотип, состоящий из предковых аллелей (информация взята из базы данных NSBI). Полученные результаты свидетельствуют о схождении всех гаплотипов, наблюдаемых в современных популяциях человека к одному общему предковому варианту, встречающемуся с частотой около 1% в популяциях тувинцев и северных киргизов и 14% у йоруба. Все наблюдаемые гаплотипы находятся в пределах 7 мутационных шагов от предкового варианта при анализе всего гена *MTHFR* и в пределах 4-х мутационных шагов от общего предка при поблочном анализе. Наблюдаемое гаплотипическое разнообразие сложилось в результате эволюции гаплотипов на протяжении длительного исторического времени и зависит от времени происхождения данной линии, скорости мутирования гаплотипов и демографической истории популяций (Li et al., 1996). Поскольку темп мутирования SNPs и разнообразие, наблюдаемое в современных популяциях, поддаются оценке, можно рассчитать время происхождения данной гаплотипической линии через оценки разнообразия. Для оценки времени коалесценции гаплотипов в качестве мутационного шага рассматривали изменения аллелей одного SNPs в одном локусе на единицу. Для всех исследованных SNPs задавали одинаковый темп мутирования (1×10^{-8} на локус на поколение), а время одного поколения принимали за 20 лет. В целом возраст генерации разнообразия по 12 исследованным SNPs гена *MTHFR* составил 314000 ± 135000 лет. Также были получены данные, свидетельствующие о незначительной роли рекомбинации в генерации генетического разнообразия локуса *MTHFR* в современных популяциях человека. Хотя проведенный филогенетический анализ является достаточно мощным и продуктивным, так как он описывает и отображает отношения между гаплотипами, следует отметить, что абсолютные оценки времени коалесценции следует интерпретировать с осторожностью, т.к. ключевым параметром, на котором строятся эти оценки, является темп мутирования.

Согласно результатам ряда исследований [Kidd, Kidd, 2008; Tenesa et al., 2007] сравнительно недавняя и быстрая экспансия человека из Африки оставила существенный «отпечаток» в нашем геноме с основными географическими различиями и биомедицинскими последствиями. Необходимо отметить, что для двух индивидуумов вариабельность генома, обуславливающая фенотипические различия, составляет всего 0,1% . Фактически большинство из этих изменений в

ДНК должно быть эволюционно нейтральным, но, тем не менее, наблюдается большое число полиморфизмов, влияющих на фенотип, которые могут быть объектами отбора или подвергнуться ему в дальнейшем [Kidd, Kidd, 2008].

В данной работе селективная нейтральность полиморфизмов гена *MTHFR* исследовалась с помощью теста Эвенса-Ваттерсона. Из всех изученных SNPs отклонение от нейтральности обнаружено только для rs4846052 и rs6541003 в выборках русских, больных КА и европеоидов из проекта HapMap. Все три функционально значимых SNPs, обусловливающие повышение уровня ГЦ в крови, оказались селективно нейтральными. Вероятно, это объясняется тем, что даже некоторое изменение фенотипа может быть селективно нейтральным, если не влияет на репродуктивную эффективность [Spiroski, 2008].

Роль давления отбора в формирование паттернов LD и уровня генетического разнообразия в популяциях оценивалась с использованием стандартных статистических тестов нейтральности Таджимы и Фу [Tajima, 1989; Fu, 1997]. В данной работе значение критерия D Таджимы оказалось отрицательным во всех исследованных популяциях, но статистически не значимым. Значение критерия Fs теста Фу было отрицательным и статистически значимым в популяциях тувинцев, северных киргизов, якутов и хантов, что свидетельствует о возможности действия отрицательного отбора на данный участок генома в этих популяциях, либо о популяционной экспансии. Однако смешение данных популяций с соседними популяциями также могло привести к увеличению разнообразия ДНК и, вместе с этим, значения критерия Fs.

Генетическая дифференциация исследованных популяций

Уровень генетической дифференциации изученных популяций по частотам аллелей 12 исследованных SNPs гена *MTHFR* составил 0,015, а по частотам гаплотипов 0,017. Оценка проводилась с помощью коэффициента F_{st}. Все изученные полиморфные варианты показали достоверную дифференциацию. Данные по отдельным локусам показывают, что наибольший вклад в межпопуляционное разнообразие вносят различия по частотам аллелей локусов rs4846052, rs1801133, rs6541003, rs2066462, rs1801131, и rs2274976. Наименьшая же степень межпопуляционного разнообразия характерна для rs17375901.

Анализ структуры неравновесия по сцеплению и ассоциаций полиморфных вариантов гена *MTHFR* с коронарным атеросклерозом

Сравнение частот генотипов и аллелей контрольной группы и группы пациентов с КА выявило значимые различия по двум полиморфным вариантам гена *MTHFR* - rs7533315 и rs2066462 (Рис. 2). Частоты мутантных аллелей T, генотипов CT и TT были достоверно выше в группе больных КА. Анализ отношения шансов также подтвердил возможную связь генетической изменчивости rs7533315 и rs2066462 с наследственной предрасположенности к КА (OR=1,60; 95% Cl: 1,08-2,36 и OR=2,71; 95% Cl: 1,13-6,72 соответственно). Частоты аллелей всех 12 исследованных SNPs, за исключением rs2066462, в контрольной группе значимо не отличались от частот у европеоидов из проекта HapMap.

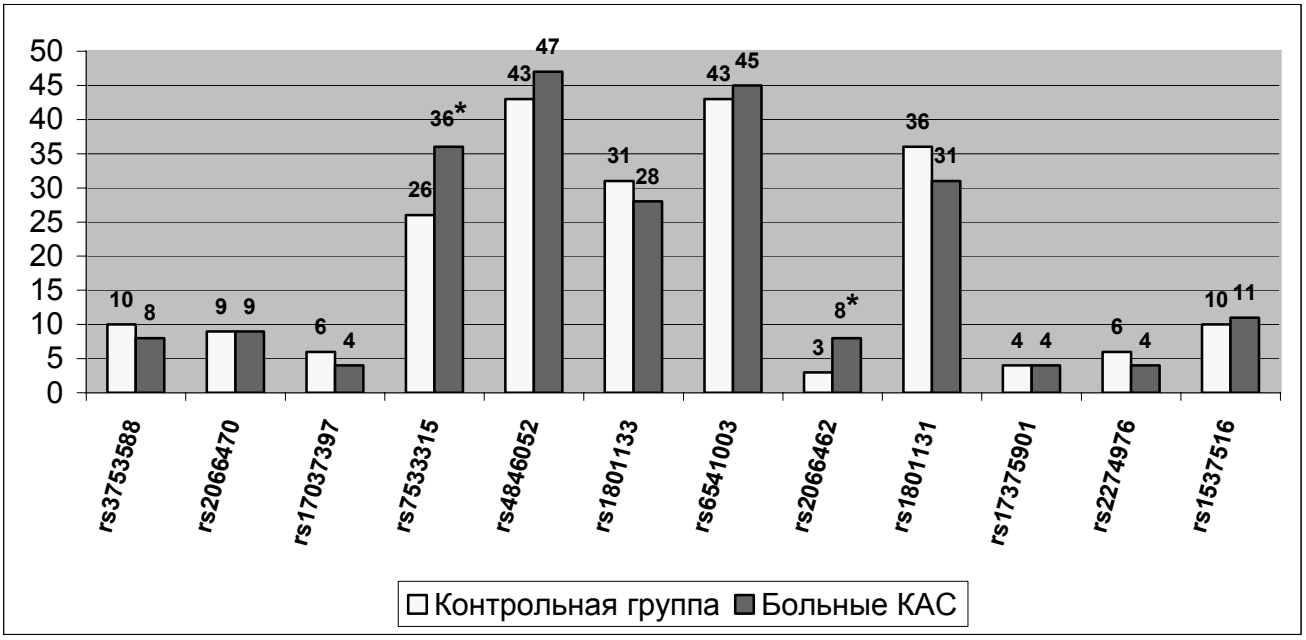

Рис. 2. Распределение частот минорных аллелей у больных КАС и в контрольной группе. Достоверные различия ($p<0,05$), полученные при сравнении частот аллелей контрольной группы и группы больных КА обозначены *.

В данном исследовании не получено достоверной взаимосвязи КА ни с одним из трех функционально значимых SNPs гена *MTHFR* (C677T, A1298C и G1793A). Однако КА ассоциирован с rs7533315, расположенной в третьем интроне гена *MTHFR*, и синонимичной заменой 7 экзона rs2066462. Можно предположить, что эффект синонимичной замены rs2066462 гена *MTHFR* на синтез кодируемого им протеина может заключаться в нарушении сплайсинга или необходимости для клетки вовлекать более редкую тРНК, что замедляет синтез белка. Что касается rs7533315, вероятно, полученная ассоциация обусловлена тем, что данный SNP находится в тесном сцеплении ($D'=1$) с несинонимичной заменой rs2274976 (G1793A), но в силу малой частоты минорного аллеля A rs2274976 связь этой миссенс-мутации с КА не удалось зафиксировать на столь небольшой выборке. Показано, что гетерозиготность по сайту G1793A приводит к повышению в крови уровня ГЦ на 40% [Mao, 2008]. Некоторые исследователи выделяют rs2274976 как клинически важный полиморфизм, особенно при анализе генетической подверженности к МФЗ, в патогенез которых вовлечены нарушения фолатного метаболизма [Melo, 2006]. Возможно также, что rs7533315 сцеплен с каким-то функционально значимым неисследованным в данной работе полиморфизмом гена *MTHFR*.

Необходимо отметить, что в различных популяциях и этно-географических группах ассоциации формируются на различном генетическом и средовом фоне. Возникновение мутации, выражающейся, допустим, в повышении предрасположенности к КА могло происходить неоднократно и в различном аллельном окружении. Известно, что любой новый аллель изначально ассоциирован с другими аллелями, на фоне которых этот аллель возник. И хотя каждый SNP может анализироваться независимо, вероятно, более информативно,

изучать их в гаплотипах, специфических для популяций вследствие уникальной демографической истории.

Структура гаплотипов и неравновесия по сцеплению у больных КА и в контрольной группе

В данной работе по локусу *MTHFR* в группе пациентов с КА обнаружено 40 гаплотипов из 4096 возможных, в контрольной выборке – 35. Гаплотипы, встречающиеся с частотой более 1%, представлены на рисунке 3. При сравнении больных КА и контрольной группы по частотам гаплотипов выявлена достоверная ассоциация с КА гаплотипа GCC**T**TCGCACGC (гаплотип № 22 на рис. 3, χ^2 с поправкой Йейтса=5,90, p=0,015; OR 2,98, 95% CI 1,53-5,88). Кроме того, обнаружен один протективный гаплотип GCCCTCGC**C**CGC (гаплотип №17 на рис. 3, χ^2 с поправкой Йейтса=8,32, p=0,004; OR 0,18, 95% CI 0,04-0,69), по остальным гаплотипам значимых различий не найдено.

Построенное медианное древо гаплотипов гена *MTHFR* демонстрирует, что именно эти два гаплотипа образовались непосредственно из предполагаемого гаплотипа-основателя. Гаплотип №22 содержит один мутантный аллель T (выделен жирным шрифтом) маркера rs7533315, для которого в данном исследовании была зафиксирована ассоциация с КА. Однако все остальные аллели данного гаплотипа являются предковыми, что указывает на возможное тесное сцепление rs7533315 с каким-то неисследованным в текущей работе функционально значимым SNP гена *MTHFR*. Гаплотип №17 также включает в себя только один мутантный аллель, принадлежащий rs1801133 (A1298C). Однако этот гаплотип оказался протективным с довольно высоким показателем отношения шансов. Показано, что использование гаплотипов, а не SNPs в ассоциативных исследованиях может существенно повысить статистическую мощность теста, особенно если предрасполагающие к заболеванию полиморфизмы не анализируются непосредственно или в случае существования высокой степени мультилокусного LD. [Schaid, 2004; Zeng, Lin, 2006]. Имитационное моделирование, проведенное Akey et al. (2001) продемонстрировало, что мощность гаплотипических тестов находится под влиянием генетической дистанции между наблюдаемыми маркерами и причинной мутацией, частот аллелей и возраста причинной мутации.

Выше нами была показана популяционная специфичность структуры LD гена *MTHFR* в различных популяциях Евразии. Настоящая работа подтверждает также наличие межпопуляционных и межгрупповых различий в структуре LD локуса *MTHFR*. В контрольной выборке, которая по своим параметрам близка к популяции русского населения города Томска, выявлены 3 блока: первый - из двух близко расположенных SNPs (rs3753588 и rs2066470), второй включает 5 полиморфизмов - rs7533315, rs4846052, rs1801133, rs6541003 и rs2066462, третий состоит из четырех SNPs - rs1801131, rs17375901, rs2274976 и rs1537516. В то же время европеоиды из проекта HapMap демонстрируют тесное сцепление 9-и из 11 проанализированных в настоящей работе SNPs, формирующих единый блок длиной 10 т.п.н. У больных коронарным атеросклерозом из томской популяции обнаружено 2 сцепленных блока. Первый, охватывающий примерно 9 т.п.н. в 5′-

области гена, включает 8 полиморфизмов (rs3753588, rs2066470, rs17037397, rs7533315, rs4846052, rs1801133, rs6541003, rs2066462). Второй блок в 3′-области *MTHFR* длиной около 6 т.п.н. составляют 4 SNPs (rs1801131, rs17375901, rs 2274976 и rs1537516). Данный блок сцепления идентичен третьему гаплотипическому блоку в контрольной выборке. Примечательно, что считающийся наиболее функционально значимым полиморфизмом гена *MTHFR* вариант C677T (rs1801133) не показывает тесного сцепления ни с одним из исследованных маркеров.

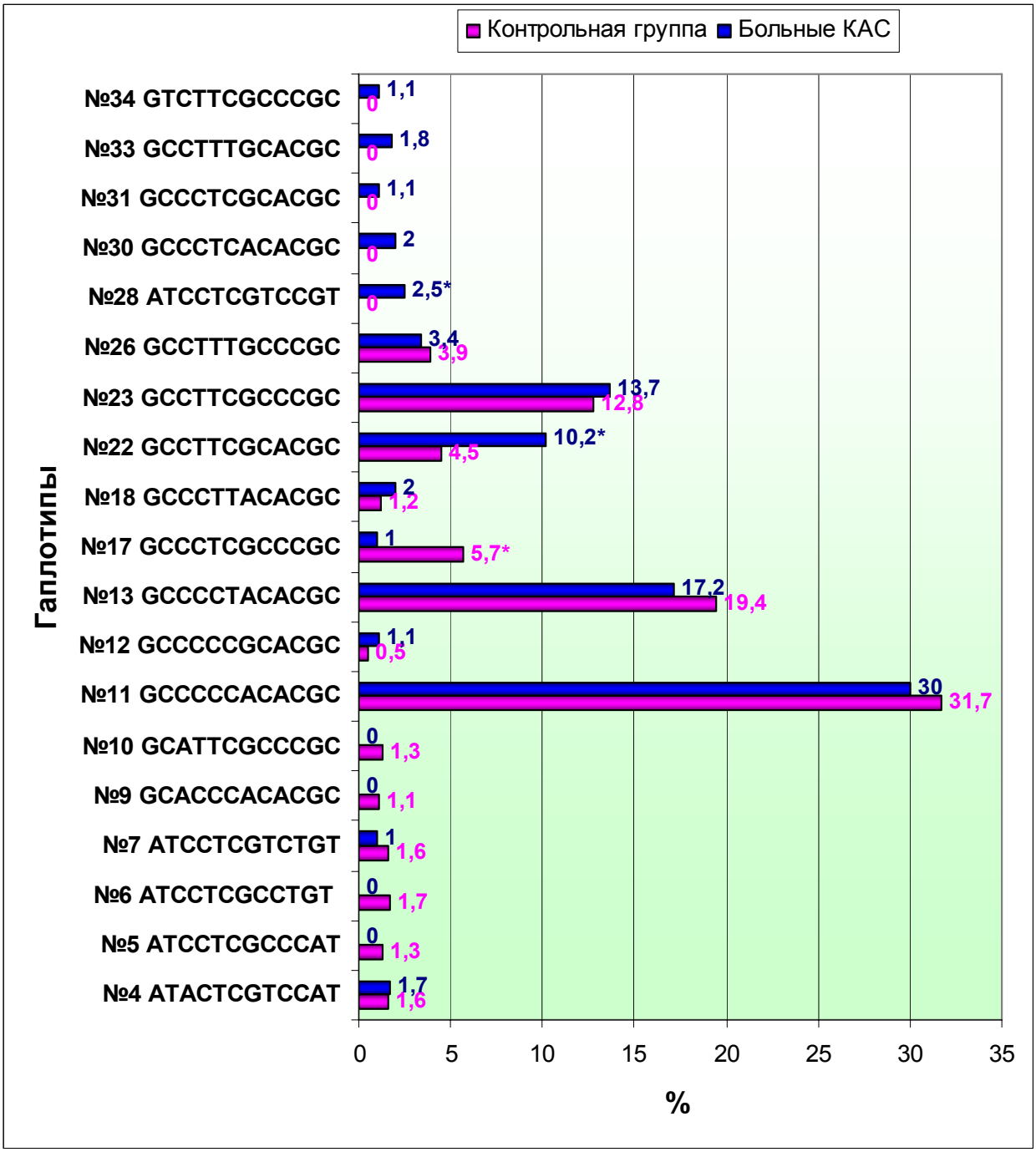

Рис. 3. Распределение частот гаплотипов у больных КА и в контрольной группе.

Ассоциированный с КА гапалотип GCCTTCGCACGC в соответствии с блочной структурой LD в локусе *MTHFR* у больных распадается на 2 более

коротких гаплотипа: гаплотип GCCTTCGC блока 1 (он является вторым по частоте среди больных - 25%) и гаплотип ACGC блока 2, который является наиболее частым вариантом (67%) этого блока в изученной выборке больных.

Дополнительным подтверждением ассоциации наблюдаемой гаплотипической структуры гена *MTHFR* с коронарным атеросклерозом в данной работе является выявленная взаимосвязь исследованные маркеров гена *MTHFR* с патогенетически значимыми показателями липидного обмена.

Анализ ассоциаций с патогенетическими значимыми количественными признаками

Согласно результатам нашего исследования, среднее содержание ТГ и ЛПНП в плазме крови, значение индекса массы тела (ИМТ) и систолического САД в группе больных с КА статистически значимо превышает данные показатели в группе сравнения. Уровни ОХ и ЛПВП достоверно выше в контрольной группе. Однако, средние значения исследуемых показателей в обеих группах в пределах референтных значений.

Посредством множественного сравнения была найдена ассоциация генотипов шести SNPs: rs7533315, rs6541003, rs2066462, rs1801131, rs17375901, rs1537516 с вариабельностью содержания в плазме общего холестерина и/или триглицеридов в группе больных КА. Необходимо отметить, что в группе больных КА максимальный уровень общего холестерина и триглицеридов соответствовал гомозиготе по «мутантному» аллелю (rs7533315, rs1801131, rs1537516) или гетерозиготе, включающий данный аллель (rs2066462, rs17375901). Обратная тенденция наблюдалась для rs6541003: носители предкового генотипа по данному локусу имели достоверно повышенные уровни общего холестерина и триглицеридов по сравнению с «мутантными» гомозиготами. Показатели САД и ДАД крови, содержание ЛПНП в плазме и ИМТ у носителей различных генотипов *MTHFR* достоверно не отличались ни в одной из групп.

Достоверная ассоциация с уровнем общего холестерина и триглицеридов у больных коронарным атеросклерозом была обнаружена для 3-х из 4-х ОНП, входящих в 3′-концевой блок сцепления (блок 2), гаплотипы которого ассоциированы с заболеванием как качественным фенотипом. Возможно, это свидетельствует о том, что физиологический механизм подверженности у носителей неблагоприятного гаплотипа блока 2 реализуется через нарушения липидного обмена, модификации белков ГЦ-тиолактоном и инициации окисления ЛПНП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе исследована структура гаплотипов и LD в гене метилентетрагидрофолатредуктазы (*MTHFR*) в 8 популяционных выборках, проживающих на территории Северной Евразии, группе больных коронарным атеросклерозом (КА) и контрольной выборке из русской популяции города Томска. Также в рамках данного исследования изучалась взаимосвязь 12 SNPs гена *MTHFR* с КА и вариабельностью патогенетически значимых количественных показателей. В качестве объекта для популяционных сравнений в работе были

использованы данные по популяции европеоидов, китайцев, японцев и йоруба, полученные в ходе реализации проекта HapMap.

В результате данного исследования была выявлена популяционная специфичность структуры LD гена *MTHFR* в различных популяциях Северной Евразии. Наряду с этим были обнаружены сходства в архитектуре LD среди некоторых популяций. У кетов, южных киргизов, японцев и китайцев все изученные SNPs входят в состав одного гаплотипического блока, что указывает на значительную силу сцепления между исследованными полиморфными вариантами. Тесное сцепление было выявлено также в выборке бурят. Популяции русских, хантов и северных киргизов характеризуются средним уровнем LD среди всех исследованных групп. Минимальная степень LD и максимальное количество небольших по размеру гаплотипических блоков в локусе *MTHFR* обнаружено в популяциях тувинцев и якутов. Полученные данные свидетельствуют о том, что архитектура LD в геноме человека в значительной степени определяется эволюционной историей популяций. Необходимо отметить, что в данной работе обнаружена различная степень гаплотипического разнообразия в исследованных популяциях, тем не менее, во всех выборках наблюдались одинаковые основные гаплотипы, что указывает на возможность общего механизма формирования данных паттернов LD.

Вариабельность структуры LD и уровень гаплотипического разнообразия гена *MTHFR* в исследованных выборках обуславливают определенный набор tag SNPs с установленной прогностической значимостью для каждой популяции. Наибольшая информативная ценность показана для 6 tag SNPs из исследованного массива данных (rs4846052, rs1801133, rs6541003, rs7533315, rs1801131 и rs3753588). Дизайн ассоциативных исследований, основанный на выборе маркеров согласно доступным на сегодняшний день картам LD с достаточно высокой плотностью SNPs, имеет несомненные преимущества, так как существенно уменьшает затраты на генотипирование и позволяет обнаружить маркеры, непосредственно не анализируемые в исследовании [Carlson et al., 2003, 2004; Gonzalez-Neira et al., 2006].

Проведенный филогенетический анализ гаплотипов свидетельствует о схождении всех гаплотипов, наблюдаемых в современных популяциях человека, к одному общему предковому варианту и о незначительной роли рекомбинации в генерации генетического разнообразия локуса *MTHFR* в исследованных популяциях. Возраст генерации разнообразия по 12 исследованным SNPs гена *MTHFR* составил 314000 ± 135000 лет.

Также в представленной работе получены данные, подтверждающие действие балансирующего отбора на локусы rs4846052 и rs6541003 у европеоидов и влияние отрицательного отбора на определенные гаплотипы гена *MTHFR* в популяциях тувинцев, северных киргизов, якутов и хантов, характеризующихся наиболее высоким уровнем гаплотипичекого разнообразия (более 70%) и низким уровнем LD среди всех исследованных групп.

Все изученные SNPs гена *MTHFR* показали достоверную дифференциацию. Данные по отдельным локусам показывают, что наибольший вклад в межпопуляционное разнообразие вносят различия по частотам аллелей локусов

rs4846052, rs1801133, rs6541003, rs2066462, rs1801131, и rs2274976. Наименьшая же степень межпопуляционного разнообразия характерна для rs17375901.

В данном исследовании получена достоверная ассоциация с КА локусов rs7533315 и rs2066462 гена *MTHFR*. Сравнение частот гаплотипов больных КА и контрольной группы выявило достоверную взаимосвязь с КА гаплотипа GCCTTCGCACGC и один протективный гаплотип GCCCTCGCCCGC. Дополнительным подтверждением связи выявленных гаплотипов с коронарным атеросклерозом в нашей работе являются данные по взаимосвязи генетического полиморфизма *MTHFR* с эндофенотипами – патогенетически значимыми количественными признаками.

Полученные в настоящей работе данные представляют, по нашему мнению, значительный интерес в понимании нескольких генетических феноменов: межпопуляционных различий в характере LD; структуры генетической компоненты МФЗ с точки зрения сравнительной информативности ассоциативных связей с болезнью на уровне отдельных маркеров и гаплотипов; функциональной значимости и плейотропного «поля действия» гена *MTHFR*.

Суммируя результаты настоящего исследования можно заключить, что анализ вариабельности с акцентом на структуру LD в популяциях человека является мощным инструментом, способным внести большой вклад в такие отрасли медико-биологической науки как эволюционная биология человека, функциональная геномика, генетика МФЗ и фармакогеномика.

ВЫВОДЫ

1. Структура LD в гене *MTHFR* носит популяционно-специфичный характер. Наиболее сильное сцепление (все SNPs входят в состав одного блока) между исследованными локусами обнаружено в популяциях кетов и южных киргизов. Тесное сцепление наблюдалось также у бурят. Популяции русских, хантов и северных киргизов характеризуются средним уровнем LD среди всех исследованных групп. Максимальное количество гаплотипических блоков (4) и слабое LD наблюдается в популяциях тувинцев и якутов.
2. В исследованных популяциях наблюдается различная степень гаплотипического разнообразия, тем не менее, во всех выборках обнаружены одинаковые основные гаплотипы (с частотой более 5%), что указывает на возможность общего механизма формирования данных паттернов LD.
3. В изученных популяциях наблюдается различный состав набора tagSNPs, являющийся, следствием вариабельности структуры LD гена *MTHFR* в исследованных выборках. Наиболее информативно ценными tagSNPs являются rs4846052, rs1801133, rs6541003, rs7533315, rs1801131 и rs3753588.
4. Проведенный филогенетический анализ гаплотипов свидетельствует о схождении всех гаплотипов, наблюдаемых в современных популяциях человека, к одному общему предковому варианту. Значимой роли рекомбинации в генерации генетического разнообразия локуса *MTHFR* у современного человека не выявлено. Возраст генерации разнообразия по 12 исследованным SNPs гена *MTHFR*, полученный при анализе филогенетического древа гаплотипов, составляет 314000 ± 135000 лет.

5. Уровень генетической дифференциации изученных популяций по частотам аллелей 12 исследованных SNPs гена *MTHFR* составил 0,015, а по частотам гаплотипов 0,017. Наибольший вклад в межпопуляционное разнообразие вносят различия по частотам аллелей локусов rs4846052, rs1801133, rs6541003, rs2066462, rs1801131, и rs2274976. Наименьшая степень межпопуляционного разнообразия характерна для rs17375901.
6. Показана ассоциация маркеров rs7533315 (OR=1,60; 95% Cl: 1,08-2,36) и rs2066462 (OR=2,71; 95% Cl: 1,13-6,72) и гаплотипа GCCTTCGCACGC (OR=2,98; 95% CI 1,53-5,88) гена *MTHFR* с КА. Выявлен один протективный гаплотип - GCCCTCGCCCGC (OR 0,18; 95% CI 0,04-0,69).
7. Характер структуры LD в группе пациентов с КА и контрольной выборке имеет во многом схожие черты: наличие «горячей точки» рекомбинации между rs2066462 и rs1801131, идентичный гаплотипический блок в 3′-области гена. Тем не менее, в 5′-области гена сцепление более выражено у больных КА.
8. Определена ассоциация генотипов шести SNPs (rs7533315, rs6541003, rs2066462, rs1801131, rs17375901, rs1537516) с вариабельностью содержания в плазме общего холестерина и/или триглицеридов в группе больных КА. С уровнем ЛПВП в данной группе показали корреляцию два полиморфных варианта (rs7533315 и rs2066462). Физиологический механизм подверженности у носителей неблагоприятного гаплотипа блока 2 реализуется через нарушения липидного обмена.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. **Трифонова Е.А.,** Степанов В.А. Структура гаплотипов локуса метилентетрагидрофолатредуктазы в якутской популяции // Якутский медицинский журнал. 2009. № 2(26). С. 40-42.
2. **Трифонова Е.А.,** Спиридонова М.Г., Пузырёв В.П., Степанов В.А. Структура гаплотипов локуса метилентетрагидрофолатредуктазы: популяционная специфичность и ассоциация с коронарным атеросклерозом // Медицинская генетика. 2009. № 1(79). С. 39-47.
3. **Трифонова Е.А.,** Спиридонова М.Г., Степанов В.А., Пузырёв В.П. Роль полиморфных вариантов некоторых генов, участвующих в развитии эндотелиальной дисфункции в формировании гестоза // Молекулярная медицина. 2009 № 1. С. 3-8.
4. **Трифонова Е.А.,** Спиридонова М.Г., Степанов В.А.. Генетическое разнообразие и структура неравновесия по сцеплению в локусе метилентетрагидрофолатредуктазы // Генетика. 2008. т.44. № 10. С. 1410-1419.
5. Спиридонова М.Г., **Трифонова Е.А.,** Фадюшина С.В, Диденко Л.И., Ерёмина Е.Р., Минайчева Л.И., Назаренко Л.П., Соколова Т.Ю., Агаркова Л.А., Габитова Т.А., Федоренко О.А., Степанов В.А., Пузырёв В.П. Молекулярно-генетический анализ полиморфных маркеров генов, ответственных за функционирование факторов эндотелиальной системы в связи с осложнённым протеканием беременности // Медицинская генетика. 2007. Т.6. №7. С.38-42.

6. Спиридонова М.Г., **Трифонова Е.А,** Фадюшина С.В, Минайчева Л.И., Назаренко Л.П., Соколова Т.Ю., Агаркова Л.А., Габитова Н.А., Федоренко О.А., Диденко Л.И., Степанов В.А.. Молекулярно-генетический анализ полиморфных маркеров генов метилентетрагидрофолатредуктазы, эндотелиальной синтазы окиси азота и ангиотензин-превращающего фермента у женщин с осложнённым протеканием беременности // Сибирский медицинский журнал. 2006. № 5. С.17-19.
7. **Трифонова Е.А.,** Степанов В.А. Ассоциация гаплотипов локуса *MTHFR* с атеросклерозом коронарных артерий // Тез. V съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров. Москва. 2009. С. 510.
8. **Трифонова Е.А.,** Спиридонова М.Г., Степанов В.А., Пузырёв В.П. Ассоциация полиморфных вариантов и гаплотипов гена *MTHFR* с коронарным атеросклерозом // Мат. III Межд. науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины». Ростов-на-Дону, 2009. С. 175-176.
9. **Trifonova E.,** Spiridonova M., Stepanov V. Genetic diversity and structure of linkeage disequilibrium in the *MTHFR* locus // European Human Genetic Conference. May 31 – June 3, Barcelona. Spain. Eur. J. Hum. Genet. 2008. V. 16, Suppl. 2. P. 323.
10. **Трифонова Е.А.,** Спиридонова М.Г., Фадюшина С.В., Гончарова И.А., Минайчева Л.И., Назаренко Л.П., Соколова Т.Ю., Степанов В.А. Молекулярно-генетический анализ полиморфизмов генов, участвующих в формировании эндотелиальной дисфункции при гестозе // Генетика человека и патология: Сб. науч. Трудов. Под ред. В.П. Пузырева. Томск: Печатная мануфактура, 2007. Вып. 8. С.124-128.
11. **Трифонова Е.А.,** Спиридонова М.Г., Фадюшина С.В., Степанов В.А. Ассоциация полиморфных вариантов генов, ответственных за функционирование факторов эндотелиальной системы, с развитием гестоза. // Мат. VIII конгр. молодых ученых и специалистов. Томск: СибГМУ, 2007. С. 138 – 139.
12. Спиридонова М.Г., **Трифонова Е.А.,** Ерёмина Е.Р., Минайчева Л.И., Назаренко Л.П., Степанов В.А. Молекулярно-генетическое исследование полиморфного варианта С677Т гена метилентетрагидрофолатредуктазы в бурятских популяциях в связи с гестозами // Мат. науч.-практ. конф. «Актуальные вопросы профилактической медицины». Улан-Удэ, 2005. С. 103-106.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДАД - диастолическое артериальное давление

САД - систолическое артериальное давление

ИБС - ишемическая болезнь сердца

ИМТ - индекс массы тела

ГГЦ - гипергомоцистеинемия

ГЦ - гомоцистеин

КА - коронарный атеросклероз

ЛПВП - липопротеины высокой плотности

ЛПНП - липопротеины низкой плотности

ЛПОНП - липопротеины очень низкой плотности

МФЗ - мультифакториальное заболевание

п.н. - пар нуклеотидов

ССЗ - сердечно-сосудистые заболевания

ХС - холестерин

ТГ - триглицериды

т.п.о. - тысяча пар оснований

LD (linkage disequilibrium) - неравновесие по сцеплению

SNP (single nucleotide polymorphism) - однонуклеотидный полиморфизм

MTHFR - 5,10-метилентетрагидрофолатредуктаза

tagSNPs (tagging single nucleotide polymorphisms) - таг-метки