

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА  
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

---

На правах рукопису

**Гулковський Роман Владиславович**

**УДК 575.11+577.21**

**ГЕННІ МУТАЦІЇ У ДІТЕЙ З ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЮ НЕДОСТАТНІСТЮ**

**03.00.22 – молекулярна генетика**

Дисертація на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Науковий керівник  
Сиволоб Андрій Володимирович,  
д.б.н., професор

КИЇВ – 2016

## ЗМІСТ

	стр.
СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	5
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	12
1.1. Інтелектуальна недостатність. Класифікація. Епідеміологія. Етіологія	12
1.2. Спадкові форми інтелектуальної недостатності	16
1.2.1. Інтелектуальна недостатність, спричинена хромосомними мутаціями	18
1.2.2. Інтелектуальна недостатність, зумовлена геномними реорганізаціями	20
1.2.3. Моногенні форми інтелектуальної недостатності	24
1.2.3.1. Х-зчеплена інтелектуальна недостатність	25
1.2.3.2. Rho ГТФазний сигнальний шлях в патогенезі інтелектуальної недостатності	29
1.2.3.3. ERK/MAP-кіназний сигнальний шлях в патогенезі інтелектуальної недостатності	31
1.2.3.4. Білки, які містять цинковий палець в патогенезі інтелектуальної недостатності	32
1.3. Стратегії пошуку нових генів-кандидатів інтелектуальної недостатності	33
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	37
2.1. Матеріали дослідження	37
2.2. Клініко-генеалогічний аналіз та формування вибірок	39
2.3. Методи дослідження	44
2.3.1. Виділення ДНК з лімфоцитів периферійної крові	44
2.3.2. Секвенування екзонів генів <i>EPHA1</i> , <i>PUS3</i> , <i>ZNF527</i> , <i>SCEL</i> та <i>Sborf223</i>	45

2.3.3. Дизайн праймерів та оптимізація умов для проведення специфічної полімеразної ланцюгової реакції	46
2.3.4. Ампліфікація ДНК <i>in vitro</i>	47
2.3.5. Аналіз точкових мутацій с.1891G>A в гені <i>EPHA1</i> та с.212A>G в гені <i>PUS3</i> методом сайт-специфічної полімеразної ланцюгової реакції	48
2.3.6. Аналіз однонуклеотидних замін в генах <i>EPHA1</i> , <i>ZNF527</i> та <i>LIF</i> методом аналізу поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів	50
2.3.7. Електрофоретичне фракціонування фрагментів ДНК в агарозному гелі	54
2.3.8. Використання біоінформатичних web-ресурсів та баз даних	54
2.3.9. Статистична обробка отриманих результатів	56
2.3.10 Множинне вирівнювання амінокислотних послідовностей	57
2.3.11. Комп'ютерне моделювання просторової структури білків за гомологією	58
<b>РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ</b>	<b>60</b>
3.1. Аналіз асоціації ідентифікованих в ході повноекзомного секвенування мутацій з патогенезом інтелектуальної недостатності в родині № 094	60
3.2. Біоінформатичний аналіз мутацій, виявлених в ході повноекзомного секвенування в генах <i>EPHA1</i> , <i>PUS3</i> , <i>ZNF527</i>	67
3.3. Порівняльний аналіз розповсюдження алельних варіантів гена <i>ZNF527</i> за заміною с.806_808CAT>TGTGCA у групі пацієнтів з легкою інтелектуальною недостатністю та популяції України	79
3.4. Порівняльний аналіз розповсюдження алельних варіантів гена <i>PUS3</i> за заміною с.212A>G у групі пацієнтів з легкою інтелектуальною недостатністю та популяції України	82
3.5. Порівняльний аналіз розповсюдження алельних варіантів гена <i>EPHA1</i> за замінами с.1475G>A та с.1891G>A у групі пацієнтів з легкою інтелектуальною недостатністю та популяції України	86

3.6. Вибір функціонально значущих поліморфних варіантів генів <i>LIF</i> та <i>EPHA1</i>	93
3.7. Дослідження поліморфізму с.4524Т>G гена <i>LIF</i> як фактора спадкової схильності розвитку легкої інтелектуальної недостатності	95
3.8. Дослідження поліморфізму гена <i>EPHA1</i> як фактора спадкової схильності розвитку легкої інтелектуальної недостатності	99
РОЗДІЛ 4. ОБГОВОРЕННЯ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	106
ВИСНОВКИ	121
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	122

## СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

CNV	–	copy number variations
dNTP	–	суміш дезоксирибонуклеотид трифосфатів
EPHA	–	ефриновий рецептор типу А
IL	–	інтерлейкін
IQ	–	коефіцієнт інтелекту
PUS	–	псевдоуридин синтаза
а.к.з.	–	амінокислотний залишок
ЗНВ	–	звичне невиношування вагітності
ІН	–	інтелектуальна недостатність
МКХ-10	–	міжнародна класифікація хвороб 10-го перегляду
МНЗ	–	мононуклеотидна заміна
МФЗ	–	мультифакторні захворювання
п.н.	–	пара нуклеотидів
ПДРФ	–	поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів
ПЛР	–	полімеразна ланцюгова реакція
т.п.н.	–	тисяча пар нуклеотидів
Тріс	–	тріс(гідроксиметил)амінометан
ЦНС	–	центральна нервова система

## ВСТУП

Актуальною задачею сьогодення є дослідження генів, пошкодження яких спричинюють спадкові захворювання людини. Нині відомо кілька тисяч спадкових патологій людини, які асоційовані із мутаціями в одному гені-детермінаторі (моногенні патології). Крім того, були сформовані уявлення про мультифакторні захворювання (МФЗ) та мультифакторні патологічні стани. Передбачається, що в патогенез МФЗ залучена низка мутацій різних функціонально пов'язаних генів (генні мережі), кожен з яких є фактором спадкової схильності. Подальші дослідження генетичних чинників моногенних та мультифакторних патологій допоможуть з'ясувати особливості генетичних програм розвитку та функціонування організму людини, молекулярну природу патогенезу захворювань та старіння.

Приблизно в 50% спадкових патологій людини відмічаються симптоми порушень функцій центральної нервової системи (ЦНС). Значна частина цих патологій асоційована з генетичними факторами, а для інших етіологія та генетична детермінованість до сьогодні не встановлені. Це стосується також і порушень когнітивних функцій, які є одними з найбільш поширених патологій в світі. Молекулярно-генетичні механізми розвитку цих патологій досі вивчені недостатньо через надзвичайну клінічну та генетичну гетерогенність та складність організації нервової системи. Попри блискучі досягнення в галузі нейрогенетики, найважливішою проблемою залишається вивчення ролі різних генів в процесі формування та роботи мозку.

Для більшості генів, що експресуються в ЦНС функціональна роль досі досліджена недостатньо. В цьому аспекті надзвичайно перспективними є дослідження геномних реорганізацій та мутацій (поліморфізмів) генів-кандидатів як чинників патогенезу нейродегенеративних та нейропсихічних патологій. В

останні роки розроблені новітні методи повногеномного скринінгу, які дозволяють картувати геномні локуси та ідентифікувати гени-кандидати різних патологічних станів. Визначення генів, білкові продукти яких залучені до розвитку та функціонування ЦНС, є важливим як з точки зору отримання нових важливих фундаментальних знань в галузі нейрогенетики, так і з точки зору дослідження генетичних основ нейродегенеративних захворювань та порушень інтелектуального розвитку (інтелектуальної недостатності – ІН).

Інтелектуальна недостатність є однією з найбільш поширених форм спадкової патології і частіш за все приводить до інвалідності у ранньому дитячому віці. Частота ІН в популяції становить 1-3% [1, 2]. Цей розлад значно впливає на якість життя самої хворої людини, її родини і суспільства в цілому. Близько 75% таких хворих потребують соціальної та освітньої підтримки протягом усього життя [3].

Значна частина випадків ІН асоційована з генетичними факторами, а в решті випадків (~60%) її генетична детермінованість до сьогодні не встановлена [4]. Не зважаючи на останні досягнення в вивченні молекулярних основ деяких форм ІН, наше розуміння патогенезу таких порушень все ще значно обмежене. Тому ідентифікація нових генів-детермінаторів, факторів спадкової схильності та генних мереж, залучених в патогенез ІН, має ключове значення для подальшого з'ясування молекулярних і фізіологічних механізмів розвитку клітин нервової системи та реалізації когнітивних функцій. Крім того, це забезпечить вирішення проблем діагностики, прогнозування перебігу захворювань, ефективного медико-генетичного консультування та пошуку шляхів терапевтичної корекції соматичних і нервово-психічних розладів при даній патології.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу геноміки людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України і виконувалась в рамках бюджетної теми «Алельний поліморфізм генів, залучених до фенотипу

моногенних та мультифакторних патологій» (шифр теми 2.2.4.13, № держ. реєстрації 0110U000695, 2011-2015 рр.). Роботу також виконано в рамках отриманого на конкурсних засадах проекту «Поліпшення діагностики розумової відсталості у дітей Центральної Східної Європи та Центральної Азії за допомогою генетичної характеристики та біоінформатики/статистики» (проект 7 Рамкової програми ЄС CHERISH, номер угоди про фінансову підтримку 223692, 2009-2012 рр.).

**Мета і завдання дослідження.** Метою роботи є з'ясування ролі мутацій, виявлених в ході повноекзомного секвенування в генах *EPHA1*, *PUS3*, *ZNF527*, *SCEL* та *Sborf223*, а також поліморфізму нуклеотидної послідовності гена *LIF*, як генетичних факторів патогенезу інтелектуальної недостатності у дітей.

Для досягнення мети були поставлені основні завдання дослідження:

1. За даними клініко-генеалогічного аналізу та дослідження відомих генетичних чинників патогенезу, а також за результатами повногеномного скринінгу патогенних Copy Number Variants, створити дослідну групу пацієнтів з інтелектуальною недостатністю.
2. Базуючись на результатах повноекзомного секвенування хворих з родини №094, провести аналіз виявлених змін нуклеотидної послідовності у двох неідентичних братів з інтелектуальною недостатністю та їх батьків.
3. Провести аналіз асоціації виявлених мутацій з патогенезом інтелектуальної недостатності серед членів досліджуваної родини №094.
4. Провести біоінформаційний аналіз консервативності амінокислотної послідовності білкових продуктів досліджуваних генів в місцях локалізації ідентифікованих мутацій та аналіз третинної структури нормальних та мутантних білкових продуктів відповідних генів.
5. Провести біоінформатичний аналіз поліморфізму послідовності ДНК генів-кандидатів розвитку інтелектуальної недостатності мультифакторної природи з метою вибору функціонально значущих поліморфних варіантів.



6. Розробити методики детекції алельних варіантів генів *EPHA1*, *PUS3*, *ZNF527* та *LIF* на основі полімеразної ланцюгової реакції.
7. Проаналізувати розподіл генотипів та алелів за досліджуваними мутаціями генів *EPHA1*, *PUS3*, *ZNF527* та *LIF* в популяційній вибірці населення України.
8. Вивчити асоціацію алельних варіантів генів *EPHA1*, *PUS3*, *ZNF527* та *LIF* з розвитком легкої інтелектуальної недостатності.

**Об'єктом дослідження** є спадкова природа інтелектуальної недостатності у дітей.

**Предмет дослідження** – гени-детермінатори та молекулярно-генетичні чинники спадкової схильності до розвитку інтелектуальної недостатності.

У роботі використовувались наступні **методи дослідження**: виділення та очищення геномної ДНК, полімеразна ланцюгова реакція, аналіз поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів, секвенування, біоінформатичне моделювання та статистична обробка даних.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше ідентифіковано міссенс мутації с.1891G>A в 11-му екзоні гена *EPHA1* та с.212A>G в 1-му екзоні гена *PUS3*. Вперше отримано дані про розповсюдження виявлених нами у пацієнтів з інтелектуальною недостатністю алельних варіантів с.1475G>A та с.1891G>A гена *EPHA1*, с.212A>G гена *PUS3* та с.806\_808CAT>TGTGCA гена *ZNF527* у популяційній вибірці населення України. Отримано моделі за гомологією просторових структур нормальних та мутантних білкових продуктів генів *EPHA1* та *PUS3*. Отримано дані на користь того, що генотип, до складу якого входять мутації с.1475G>A та с.1891G>A в гені *EPHA1* є генетичним чинником інтелектуальної недостатності моногенної природи. Встановлено, що носійство алельних варіантів 1475A гена *EPHA1* та 4524G гена *LIF* є фактором спадкової схильності до розвитку інтелектуальної недостатності мультифакторної природи. Показано, що носійство алельних варіантів 3022C та 1399A гена *EPHA1* має

протекторний ефект, що зумовлює знижений відносний ризик розвитку інтелектуальної недостатності у дітей.

**Практичне значення одержаних результатів.** Ідентифіковано *EPHA1* як новий потенційний ген-детермінатор інтелектуальної недостатності та розроблено методики детекції мутантних варіантів с.1475G>A та с.1891G>A, що створює передумови для покращення диференційної діагностики інтелектуальної недостатності. Розроблено діагностичні методики для генетичного тестування маркерів спадкової схильності до розвитку інтелектуальної недостатності, що базуються на аналізі поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів продуктів специфічної ампліфікації *in vitro* ділянок послідовності генів *EPHA1* та *LIF*.

**Особистий внесок здобувача.** Весь обсяг експериментальної частини дисертації, пошук та обробку літературних даних виконано автором особисто. Здобувачем особисто проведено: біоінформатичний аналіз досліджуваних мутацій та поліморфних варіантів, дизайн праймерів, підбір температурно-часових режимів проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), а також параметрів електрофоретичного розділення продуктів ПЛР та умов проведення аналізу поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів для детекції поліморфних варіантів досліджуваних генів. Аналіз клінічних даних проведено спільно з І.М. Бриль, Г.М. Бичковою, Н.О. Афанасьєвою, Е.Й. Пацкун, Н.О. Зимаєв-Закутньою, С.Ю. Логущ, Л.Ю. Силаєвою (лікарі-генетики медико-генетичних центрів України). Планування досліджень, обговорення, аналіз, інтерпретацію отриманих даних і підготовку публікацій до друку здійснено разом із науковим керівником.

Автор висловлює слова щирої вдячності завідувачу відділу геноміки людини Інституту молекулярної біології та генетики НАН України, д.б.н., проф. Лівшиць Л.А. за допомогу в розробці стратегії досліджень, виборі підходів до проведення аналізу та узагальненні результатів досліджень, а також всім співробітникам відділу геноміки людини Інституту молекулярної біології і

генетики НАН України за підтримку і сприяння у виконанні досліджень. З усіма перерахованими науковцями автор має спільні публікації.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення роботи доповідались на вітчизняних та зарубіжних з'їздах та конференціях: Європейській конференції з генетики людини (Париж, Франція 2013), Європейській конференції з генетики людини (Мілан, Італія 2014), BIO 2014 Congress (Варшава, Польща 2014), IX Міжнародній конференції молодих науковців “Біологія: від молекули до біосфери” (Харків, Україна 2014), XI Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів “Молодь і поступ біології” (Львів, Україна, 2015), Європейській конференції з генетики людини (Глазго, Шотландія, Велика Британія 2015).

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 11 друкованих праць, зокрема – 5 статей у фахових наукових виданнях та тези 6 доповідей на вітчизняних та міжнародних конференціях і з'їздах.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, результатів експериментальних досліджень, обговорення та узагальнення результатів досліджень, висновків та списку використаних джерел. Роботу викладено на 145 сторінках стандартного друкованого тексту, проілюстровано 22 рисунками та 12 таблицями. Список використаної літератури охоплює 255 найменувань.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Інтелектуальна недостатність. Класифікація. Епідеміологія. Етіологія

Інтелектуальна недостатність (ІН) або розумова відсталість є однією з найбільш поширених форм спадкової патології (1-3% населення), що включає різні з клінічної точки зору явища і частіш за все приводить до інвалідності у ранньому дитячому віці [1, 2]. Усі ці явища об'єднують виявлені в ранньому віці (в період формування психіки) порушення адаптивної поведінки, пов'язані з недостатнім розвитком пізнавальних здібностей. Інтелектуальна недостатність – вроджене або рано набуте (в перші 3 роки життя) недорозвинення рівня психічної, в першу чергу інтелектуальної діяльності, обумовлене порушенням розвитку, диференціації та функціонування ЦНС. Поряд з ІН завжди має місце недорозвинення емоційно-вольової сфери, мови, моторики й особистості загалом. Цей розлад значно впливає на якість життя самої хворої людини, її родини і суспільства в цілому. Близько 75% таких хворих потребують соціальної та освітньої підтримки протягом усього життя [3]. Тому реабілітацію людей з інтелектуальною недостатністю, скорочення її негативних наслідків можна розглядати як проблему громадського здоров'я, дослідженням якої займаються вчені різних країн не одне десятиліття.

В цілому, ІН є клінічно й генетично дуже гетерогенним станом, причинами якого можуть бути фактори як генетичної природи, так і навколишнього середовища (екзогенні). Етіологія інтелектуальної недостатності в багатьох випадках складна і не визначається єдиною причиною. У більшості випадків несприятливі умови зовнішнього середовища в комплексі з генетичною схильністю

виступають в складній взаємодії та єдності [5]. Причини ІН різняться залежно від тяжкості стану: помірні, важкі та глибокі форми ІН (IQ менше 50) найімовірніше пов'язані з єдиною патологічною причиною (генетичною чи екзогенною), тоді як легкі форми (IQ між 50 і 70) є скоріше мультифакторними за походженням [5, 6].

Ще в 1952 році була сформульована гіпотеза, відповідно до якої, за формування ІН відповідальні дві принципово різні групи етіологічних факторів [7]. Перша група так званих "мегафенних" факторів, що обумовлює важчі форми ІН (IQ менше 50 балів), включає чинники, які значно дезорганізують формування структури і функції головного мозку [7, 8]. Це і екзогенні чинники (важкі травми мозку, нейроінфекції тощо), і генетичні чинники (70-80% випадків важкої ІН пов'язані з генетичними порушеннями) [7, 8]. Другу групу етіологічних "мікрофенних" факторів, що включають спадковий і екзогенний компоненти і дають сумарний ефект, пов'язують з легкою інтелектуальною недостатністю (IQ між 50 і 70 балами) [7, 8]. В даному випадку спадкові компоненти розглядаються як конституціональні особливості, що відбивають сімейну обтяженість (генетичну схильність), а екзогенні – як сума негативних впливів середовища біологічного та культурно-сімейного характеру (несприятливі екологічні чинники, неповноцінне харчування, психоемоційна депривація, соціально-економічний рівень сім'ї тощо), що перешкоджають розвитку інтелекту індивіда в рамках його генетичного потенціалу.

Попри значні досягнення в галузі медичних технологій, молекулярної біології та генетики, що підвищили ймовірність визначення причини порушення інтелекту у пацієнта, через значну клінічну та генетичну гетерогенність, для ~60% випадків ІН етіологія залишається невстановленою [4]. Загалом, серед важких форм інтелектуальної недостатності етіологію вдається встановити в 20-40% випадків, серед легких форм – значно рідше (10-12%) [9-14].

Екзогенні фактори, що приводять до порушення інтелектуального розвитку можна розділити на: пренатальні, перинатальні та постнатальні. У зв'язку з тим, що саме нервова тканина найбільш чутлива до найрізноманітніших тератогенних

впливів, ці фактори можуть бути причиною антенатально та постнатально обумовленої ІН. Екзогенні форми складають не менше половини всіх вад розвитку пізнавальної сфери і більшість випадків пов'язана з ураженням головного мозку в пренатальному періоді [1, 9-12].

До пренатальних факторів, тобто тих, що діють в період вагітності, можна віднести внутрішньоутробне фізичне, хімічне або інфекційне ураження зародка і плода (ембріопатії і фетопатії) – наслідки внутрішньоутробних інфекцій: краснуха, грип, паротит, токсоплазмоз, лістеріоз, сифіліс тощо; наслідки інтоксикацій (наприклад, вживання матір'ю алкоголю, лікарських засобів, психоактивних і нейротоксичних речовин тощо); недостатності живлення плода; захворювань внутрішніх органів та гормональних порушень у матері; внутрішньоутробної асфіксії, ацидозу, гіпоксії і крововиливів в мозок; радіоактивного опромінення тощо. Внутрішньоутробні інфекції, як етіологічний фактор, діагностуються приблизно у 4-5% хворих з глибокою ІН і менш ніж у 1% хворих з більш легким ступенем ІН [9-11].

Роль перинатальної патології тобто, отриманої під час пологів, досить скромна – 7-8% випадків ІН (головним чином гіпоксія) [9-11]. Перинатальні фактори включають крововилив в мозок, аноксію (кисневе голодування), механічне пошкодження головного мозку під час пологів тощо.

У постнатальному періоді (перші роки життя) в якості етіологічних факторів ІН частіше виступають нейроінфекції (енцефаліт, менінгоенцефаліти), дистрофічні захворювання, важкі інтоксикації, черепно-мозкові травми, неповноцінне харчування і психоемоційна депривація (нестача фізичної, емоційної та когнітивної підтримки, необхідної для росту, розвитку та соціальної адаптації), у тому числі педагогічна занедбаність в неблагополучних сім'ях [9-11].

Фактор спадковості є одним з ведучих у виникненні ІН. Прийнято вважати, що від 25 до 50% всіх випадків інтелектуальної недостатності – це генетично обумовлені стани [9-14]. Епідеміологічні дослідження неодноразово вказували на

наявність зсуву у співвідношенні випадків ІН серед чоловіків і жінок – серед чоловіків на 30-50% більше випадків ІН [1, 12]. Цей факт дозволив припустити, що більша частина надлишку ІН серед чоловічого населення може бути пов'язана з Х-зчепленим типом спадкування. На сьогодні вже відомо кілька сотень різних спадкових патологій, так званих елементарних нозологічних генетичних одиниць, що супроводжуються інтелектуальною недостатністю, і продовжують виділятися нові спадкові форми.

Існують різні принципи класифікації ІН, які враховують причини захворювання, особливості патогенезу, вікову динаміку і статеві ознаки та орієнтуються на Міжнародну класифікацію хвороб 10-го перегляду (МКХ- 10, клас 5 – розлади психіки і поведінки) Всесвітньої організації охорони здоров'я при ООН [6]. У МКХ-10 ІН кодують в рубриці F70 в залежності від вираженості. В якості основного діагностичного орієнтира використовують загальний коефіцієнт інтелекту (IQ), що визначається за допомогою методики Векслера [15]. Некоректно було б оцінювати тяжкість ІН лише на підставі коефіцієнта інтелекту (IQ). Тому МКХ-10 також враховує вираженість порушення поведінки, рівень допомоги та догляду, необхідний пацієнтові тощо. Такий підхід фокусується на сильних і слабких сторонах особистості та співвідношенні їх з потребами оточення пацієнта, а також очікуваннями і ставленням з боку сім'ї та суспільства. Таким чином, класифікація МКХ-10 (клас 5) враховує як біологічні, так і соціальні складові психічної і поведінкової патології та їх вікову динаміку в онтогенезі особистості [6].

На сьогоднішній день за МКХ-10 можна виділити чотири ступені ІН:

- легка (F70) – IQ в діапазон 50-69;
- помірна (F71) – IQ в діапазоні 35-49;
- важка (F72) – IQ в діапазоні 20-34;
- глибока (F73) – показник нижче 20.

Четвертий знак (наприклад F71.1 – значне порушення поведінки при помірній інтелектуальній недостатності, вимагає догляду і лікування) використовують для

визначення вираженості поведінкових порушень, якщо вони не обумовлені супутнім психічним розладом:

- 0 – мінімальне значення порушень або їх відсутність;
- 1 – значні поведінкові порушень, що вимагають лікувальних заходів;
- 8 – інші поведінкові розлади;
- 9 – поведінкові порушення не визначені [6].

За іншою класифікацією виділяють також синдромальні і несиндромальні форми захворювання. У першому випадку ІН супроводжується вадами фізичного розвитку, дизморфізмом розвитку скелету, черепно-лицьовим дизморфізмом та/або неврологічними порушеннями тощо. В той час, як перебіг несиндромальних форм відбувається без супутніх патологій [5, 16].

Частота помірної та важкої ІН в популяції становить 0,3-0,5%, а при врахуванні легких форм вона досягає 1,5-3% [1, 2, 10]. Тобто біля 85% пацієнтів мають легку форму ІН. Частка середньої, важкої і глибокої інтелектуальної недостатності становить відповідно ~10%, 4% і 1% [10]. Поширеність ІН в Україні складає близько 600 осіб на 100 тис. [17, 18].

## 1.2. Спадкові форми інтелектуальної недостатності

Генетичні аномалії, без сумніву, є однією з основних причин порушень інтелектуального розвитку, але, попри останні досягнення у вивченні молекулярних основ деяких форм ІН, наше розуміння патогенезу таких порушень все ще значно обмежене. Різноманітність спадкових патогенних факторів і неспецифічність інтелектуальної недостатності, як фенотипової ознаки, ускладнюють оцінку причинно-наслідкових зв'язків у патогенезі ІН. Це позначається також на показниках медичної статистики поширеності спадкових форм даної патології, частка яких серед осіб з ІН коливається від 25 до 80% [1, 2, 5, 7, 9-14, 16, 19]. Проте цей показник збільшується пропорційно тяжкості, наприклад, з генетичними



дефектами пов'язують 70-80% випадків важкої ІН (IQ<50) [1, 9-14, 19]. Генетичними та екзогенними факторами можна пояснити, в приблизно рівних пропорціях, біля 30% випадків легкої інтелектуальної недостатності; для решти 70% випадків встановити етіологічний діагноз на даний час не вдається [9-14].

В основі вивчення генетичних факторів, пов'язаних зі змінами розвитку та функціонування ЦНС, покладено молекулярно-генетичний аналіз послідовності геномної ДНК, епігенетичних змін регуляторних ділянок генів, а також цитогенетичний аналіз змін структури і числа хромосомних ділянок у клітині. Спадкові форми ІН можна класифікувати за типом генетичних дефектів, що їх спричинили. Найбільш частими генетичними причинами інтелектуальної недостатності є кількісні та структурні аномалії хромосом. Форми ІН, спричинені хромосомними мутаціями, найбільш поширеною з яких є синдром Дауна, можуть бути виявлені у 15-25% пацієнтів з ІН (40% важкого (IQ <55) і 10-20% легкого ступеня) завдяки рутинним методам цитогенетичного аналізу [1, 5, 13, 20, 21]. Основна клінічна особливість хромосомних хвороб – інтелектуальна недостатність в поєднанні з множинними вадами розвитку.

В останнє десятиліття зросла кількість повідомлень про внесок субмікроскопічних геномних реорганізацій або варіацій числа копій генів (Copy Number Variants – CNVs) в патогенез ІН, які виникають в результаті геномних перебудов типу делецій/дуплікацій розміром більше 1 т.п.н. [11]. Це пов'язано з розвитком нових технологій, таких як серійна порівняльна геномна гібридизація або array-CGH (genome-wide microarray comparative genomic hybridization), яка ґрунтується на використанні генетичних мікрочіпів. Обумовлена геномними реорганізаціями ІН становить приблизно 10-20% усіх випадків порушень інтелекту [20-25].

Крім того, на сьогодні описані тисячі моногенних дефектів, які зумовлюють порушення інтелектуального розвитку, серед яких особливе місце займають захворювання, зчеплені з X-хромосою. X-зчепленими формами ІН, серед яких

найрозповсюдженішими є синдроми Мартіна-Белл та Ретта, пояснюється близько 10% усіх випадків порушень інтелекту [20, 26-28]. Серед моногенних захворювань, що можуть спричинити ІН численну групу також становлять спадкові дефекти обміну речовин, зокрема ензимопатії. Прикладом таких патологій є фенілкетонурія.

Унаслідок адитивної дії багатьох генів та екзогенних чинників середовища легка ІН частіше зумовлена взаємодією генетичних факторів та зовнішнього середовища, що визначає її як мультифакторну патологію. Така інтелектуальна недостатність, як правило, не супроводжується неврологічними розладами та виразними морфологічними відхиленнями. Легка ІН складає біля 85% усіх випадків, однак вивчена недостатньо, тому досі складно оцінити етіологічний внесок генетичних дефектів.

Загалом, етіологія інтелектуальної недостатності в багатьох випадках залишається нез'ясованою і не визначається єдиною причиною, тому виявлення нових генів і генних мереж, які можуть впливати на виникнення таких розладів, необхідне для кращого розуміння нейробіологічних механізмів, що лежать в основі поведінкових і когнітивних порушень.

### **1.2.1. Інтелектуальна недостатність, спричинена хромосомними мутаціями.**

Хромосомні захворювання – це клінічні стани, зумовлені порушенням числа або структури хромосом. Загалом, більш ніж у 1% всіх новонароджених дітей спостерігаються хромосомні аномалії, а інтелектуальна недостатність, обумовлена хромосомними порушеннями, складає приблизно 10-12% усіх випадків [1, 5, 20, 21].

Більшість хромосомних захворювань мають спорадичний характер, тобто виникають внаслідок мутації у процесі гаметогенезу чи при перших поділах зиготи, а не успадковуються в поколіннях, що пов'язано з високою смертністю хворих в дитячому віці, а також порушенням статевого дозрівання та безпліддям. Фенотипічну основу хромосомних захворювань формують порушення раннього ембріонального періоду. Саме тому патологічні зміни відбуваються ще в пренатальному періоді розвитку організму і обумовлюють або загибель ембріона чи

плода, або вроджену патологію новонароджених. До теперішнього часу описано вже кілька десятків добре охарактеризованих хромосомних синдромів, і процес цей триває.

Хромосомні захворювання можна розділити на спричинені анеуплоїдіями – зміною кількості аутосом або статевих хромосом, та спричинені хромосомними абераціями – структурними змінами хромосом (транслокаціями, делеціями, дуплікаціями, інверсіями, фрагментаціями, кільцеподібними хромосомами тощо). Розглядаючи окремі нозологічні форми, в першу чергу можна виділити синдром Дауна (трисомія за 21-ю хромосомою), який є найбільш поширеним спадковим захворюванням [29-32]. Усі хворі характеризуються інтелектуальною недостатністю різного рівня: 5% – легкою, 75% – помірною та важкою, 20% – глибокою [29]. Синдром Дауна характеризується каріотипом 47,XX,21+ або 47,X,Y,21+. Частота серед новонароджених 1:700 – 1:1000, що складає від 5 до 15% хворих з ІН [29-33]. Співвідношення хворих хлопчиків та дівчаток дорівнює 1:1. Частота народження дітей з синдромом Дауна залежить від віку матері і суттєво зростає після 35 років, а у віці 45 років складає 1:12 [34]. Існує ще дві форми даного синдрому. Робертсонівськими транслокаціями в каріотипі одного з батьків може бути спричинений так званий сімейний синдром Дауна – транслокації довгого плеча 21-ї хромосоми на інші хромосоми (частіше на 15, рідше на 14, 21, 22 і Y-хромосому) [35-38]. Дана форма синдрому складає 4% випадків [35-38]. При нерозходженні хромосом в клітині зародка на ранніх стадіях його розвитку, в результаті чого порушення каріотипу зачіпає тільки деякі тканини і органи, виникає мозаїчний варіант синдрому – 5% усіх випадків [35-38].

Прикладами хвороб, спричинених зміною кількості статевих хромосом, є синдроми Шерешевського-Тернера та Клайнфельтера. За цих порушень розумові та психічні аномалії відзначаються меншою тяжкістю, ніж за порушень кількості аутосом. Синдром Шерешевського-Тернера характеризується каріотипом 45,XO [39, 40]. Це єдина форма моносомії у людини, яка сумісна з життям. Частота синдрому

серед новонароджених осіб жіночої статі становить 1:2000 [41]. Синдром Шерешевського-Тернера супроводжується незначним відставанням інтелектуального розвитку лише у 16-25% випадків [42]. Синдром Клайнфельтера, що спостерігається у осіб чоловічої статі, характеризується каріотипом 47,XXY [43]. Частота даного синдрому серед новонароджених хлопчиків складає 1:500 [44-46]. Порушення інтелектуального розвитку зустрічається приблизно у 25% хворих, частіше воно виражене не різко, але в окремих випадках спостерігається легка ІН і виявляється вже в ранньому дитячому віці [47]. Виявлено також декілька типів полісомій за X і Y- хромосомами, які теж можуть спричинювати ІН: 48,XXXX; 49,XXXXX; 48,XXXY; 49,XXXXY; 48,XYYY; 48,XXYY; 49,XXXY [48-55]. Ступінь тяжкості ІН асоційований із зростанням кількості додаткових хромосом [48].

**1.2.2. Інтелектуальна недостатність, зумовлена геномними реорганізаціями.** Геномні реорганізації або варіації числа копій генів (CNV) являють собою делеції чи дуплікації певної ділянки геномної ДНК і можуть включати від одного до десятків генів, іноді, сотень генів [56-58]. Розмір їх варіює від декількох тисяч до мільйонів пар нуклеотидів. Варіації числа копій можуть успадковуватися від батьків або виникати *de novo* в будь-якій ділянці генома. Подібні реорганізації в деяких регіонах геному з некодуючою ДНК можуть бути нейтральними і не проявлятися фенотипово [59-61]. Проте значна частина CNVs, що можуть бути причинними факторами ІН та аутизму, є рідкісними і найчастіше не виявляються в контрольних групах [62]. Більше 41% CNV перекриваються з відомими генами, що вказує на їх можливу роль у зміні рівня експресії через так званий "ефект дози гена" [1]. Синдроми, зумовлені хромосомними абераціями, теж супроводжуються вадами інтелектуального розвитку. За останні роки було продемонстровано, що геномними реорганізаціями можуть бути обумовлені 15-20% всіх випадків ІН [63].

Активний розвиток новітніх молекулярно-біологічних методів дав можливість виділити нову нозологічну групу мікроделеційних та мікродуплікаційних

синдромів [64, 65]. Частота виникнення більшості з цих синдромів дуже не значна – 1:500000-100000 новонароджених. Проте деякі з цих геномних реорганізацій досить часті, наприклад, мікрodelеції короткого плеча 1-ї хромосоми (1p36.1) виявляють у ~1% пацієнтів з ідіопатичною ІН [66, 67]. Клінічна картина мікрodelеційних/мікродуплікаційних синдромів, як правило, чітка – діагноз можна встановити за сукупністю симптомів [64, 65]. Ступінь клінічних проявів цих синдромів коливається у залежності від розмірів delеції або дуплікації.

Найпоширенішими серед них є: синдром Вільямса [68, 69], синдром котячого крику (від фр. Cri-Du-Chat Syndrome) або синдром Лежена [70, 71], синдром Вольфа-Хіршхорна [72, 73], синдром Ді Джорджі (delеція 22q11.2) [74, 75], мікрodelеційні синдроми 1p36 [66, 67] та 16p11.2-12.2 [76, 77] тощо. Синдром Вільямса (синдром «обличчя ельфа») спричинений delецією в довгому плечі 7-ї хромосоми (7q11.23), яка охоплює близько 15 генів [68, 69]. Популяційна частота захворювання варіює в межах 1:10 000-25 000 новонароджених незалежно від статі [78]. Майже всім хворим властива помірна інтелектуальна недостатність (IQ у межах 40-68 балів) [78]. Пацієнти з синдромом котячого крику та синдромом Вольфа-Хіршхорна мають тяжке порушення інтелекту і значно знижену тривалість життя. Синдром котячого крику характеризується каріотипом 46,XX,5p- або 46,XY,5p-; тобто частковою delецією короткого плеча 5 хромосоми [70, 71]. При цитогенетичному аналізі в більшості випадків спостерігається delеція з втратою від 1/3 до 1/2 довжини короткого плеча 5 хромосоми [70, 71]. Частота виникнення синдрому – 1:50000 новонароджених, частіше зустрічається серед жінок (співвідношення серед чоловіків і жінок становить 3:4) [71]. Більшість хворих помирає в перші роки життя, тільки 10% досягають 10 річного віку [71]. Синдром Вольфа-Хіршхорна обумовлений термінальною delецією короткого плеча 4-ї хромосоми [72, 73]. Delецією "de novo" частини короткого плеча виявляють приблизно у 80% випадків (розміри delеции коливаються від невеликих термінальних до delеції половини дистальної частини плеча) [79]. Решта випадків

обумовлені транслокаціями або кільцевими хромосомами, але завжди при цьому відзначається втрата фрагмента 4p16 [79]. Частота народження дітей з синдромом Вольфа-Хіршхорна складає приблизно 1:96000 живих новонароджених [73, 79]. Близько 20% пацієнтів з синдромом Вольфа-Хіршхорна вмирають у перші роки життя, причому 50% з них – в неонатальному періоді [73, 79].

До спадкових патологій, спричинених хромосомними абераціями, можна зарахувати також хвороби імпринтингу, серед яких найвідомішими є спадкові синдроми Прадера-Віллі та Ангельмана [80-83]. Встановлено, що синдром Прадера – Віллі може бути обумовлений двома основними механізмами. В 70-75% випадків причиною синдрому є мікрделеція 15-ї хромосоми (15q11.2-q13) батьківського походження, в ~25% випадків – ізодисомією за материнською 15-ю хромосоною, тобто коли обидві хромосоми отримані від матері [80-83]. У незначній кількості випадків (1%) синдром пов'язаний з порушенням центру імпринтингу в ділянці 15q11.2-q13 [80-83]. Розвиток синдрому Ангельмана, навпаки пов'язаний з мікрделецією тієї ж ділянки 15-ї хромосоми материнського походження (80% випадків) чи батьківською ізодисомією (10-15%), рідше – мутацією в гені *UBE3A* материнського походження [80-85]. Майже у всіх пацієнтів з синдромом Прадера-Віллі відзначають затримку інтелектуального розвитку, але значення їх коефіцієнта інтелекту може варіювати в широкому діапазоні: 32-40% хворих мають рівень інтелекту дещо нижче середнього або знаходиться на нижній межі інтелектуальних здібностей (~5% мають низький середній рівень інтелекту – IQ=85-90, ~27% на межі інтелектуальних здібностей – IQ=70-85); 34% – легку ІН; 27% – помірну ІН; 5% – тяжку ІН; до 1% – глибоку ІН [86]. Хворі на синдром Ангельмана страждають тяжкою інтелектуальною недостатністю [85].

Використання новітніх методів сканування генома, що базуються на порівняльній геномній гібридизації, таких як агау CGH, дозволяє виявляти мікроаномалії генома та з найбільшою ефективністю визначати точки розриву при хромосомних аномаліях. Технологія агау CGH дозволяє одночасно аналізувати

весь геном на предмет числових і незбалансованих структурних аберацій хромосом з роздільною здатністю до декількох тисяч пар нуклеотидів в ході однієї реакції гібридизації і підвищує ефективність молекулярної діагностики в групах дітей з вадами розвитку та ІН.

Наразі невідомо точне число спадкових захворювань, обумовлених CNV. Так, до теперішнього часу описано 211 мікроделеційних і 79 мікродуплікаційних синдромів, що захоплюють 267 геномних локусів [64, 65]. Як правило, подібні варіації генома зачіпають гени, які кодують білкові молекули, що беруть участь в процесах функціонування нейронів і в критичних біологічних процесах в ході внутрішньоутробного розвитку ЦНС. Ідентифікація окремих генів, що впливають на виникнення захворювання, дозволяє виявити механізм, що лежить в основі порушення розвитку та функціонування ЦНС. Проте з точністю визначити порушення, що приводить до конкретного розладу, можливо, тільки виявивши мережу пов'язаних між собою генів. Велике значення в цих дослідженнях має біоінформатичний аналіз великого обсягу даних щодо особливостей CNV, накопичених до теперішнього часу в різних лабораторіях світу. В даний час ця область геноміки та біоінформатики активно розвивається, створюються динамічні та загальнодоступні бази даних CNVs [87]. Слід відзначити базу даних варіації числа копій Toronto Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation>), бази даних CNVs з клінічним описом пробандів DatabasE of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources (DECIPHER; <https://decipher.sanger.ac.uk/information>) та European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations (ECARUCA; <http://www.ecaruca.net>).

Застосування новітніх методів геномного аналізу та біоінформатики дозволяє картувати геномні локуси та ідентифікувати чутливі до дози гени-кандидати різних нейродегенеративних та нейропсихічних патологій.

**1.2.3. Моногенні форми інтелектуальної недостатності.** На сьогодні відомо більше тисячі генів-детермінаторів моногенних форм ІН. Проте, більшість цих

форм є дуже рідкісними захворюваннями, точна діагностика яких практично здійснюється в спеціалізованих медико-генетичних центрах з використанням, як клінічних, так і лабораторних генетичних методів. Численну групу серед моногенних захворювань, що можуть спричинити ІН, становлять спадкові дефекти обміну речовин, зокрема – ензимопатії. Відомо понад 100 ензимопатій, які успадковуються за аутосомно-рецесивним або Х-зчепленим рецесивним типами і майже для половини розроблено методи медикаментозного чи дієтологічного лікування. Однією з найпоширеніших і вивчених ензимопатій є фенілкетонурія – захворювання з аутосомно-рецесивним типом успадкування. Ген фенілаланінгідроксилази, мутації в якому обумовлюють розвиток фенілкетонурії, було картовано і ідентифіковано одним з перших в геномі людини [88, 89]. Основний наслідок цього захворювання полягає в ІН. Вчасна дієтотерапія допомагає приблизно в 90% випадків попередити розвиток розумової відсталості.

У більшості країн світу розроблені програми скринінгу новонароджених на фенілкетонурію. В Україні ця програма діє, починаючи з 1971 року. Завдяки цим програмам не тільки стало можливим пресимптоматичне лікування хворих, але й встановлення частоти цього захворювання в різних країнах. В Україні на 8300 новонароджених народжується одна дитина хвора фенілкетонурією, причому в різних регіонах частота фенілкетонурії суттєво відрізняється [90, 91].

Близько 16% генів-детермінаторів моногенних форм ІН локалізовані на Х-хромосомі [12, 92, 93]. Тому серед моногенних спадкових хвороб, що супроводжуються порушенням інтелектуального розвитку особливе місце займають захворювання, зчеплені з Х-хромосомою. Х-зчепленими формами ІН пояснюється близько 10% усіх випадків порушень інтелекту [12, 92-95]. Крім Х-зчеплених та аутосомно-рецесивних моногенних форм ІН за типами успадкування можна виділити ще і аутосомно-домінантні. Аутосомно-домінантні форми – це в переважній більшості нейродегенеративні патології з пізньою маніфестацією.



Найбільш відомою є хорея Гентінгтона (ген *HD*, який кодує білок гентінгтин, локалізований в хромосомній ділянці 4p16.3.) [96].

Зі збільшенням кількості відомих генів детермінаторів ІН збільшується і відсоток генів, для яких з'ясовані функції та генні мережі, в межах яких ці гени взаємодіють. Вже сьогодні можна виокремити кілька подібних генних мереж, таких як гени синаптичних протеїнів, гени ефекторів Rho ГТФазного та ERK/MAP-кіназного сигнальних шляхів чи гени транскрипційних факторів родини Kruppel-associated box (KRAB) family zinc finger proteins тощо [16]. Якщо вдасться підтвердити та детально вивчити механізм залучення подібних генних мереж та їх окремих елементів в патогенез ІН, це дасть змогу розробити діагностичні процедури та тести для конкретних біохімічних маркерів, які можуть вказувати на рівень активності конкретних генних мереж. Що суттєво звужить коло генів-кандидатів ІН у кожному конкретному випадку і підвищить ефективність та доступність діагностики інтелектуальної недостатності.

*1.2.3.1. X-зчеплена інтелектуальна недостатність.* X-зчеплена ІН (XLMR- X-linked mental retardation або XLID- X-linked intellectual disability) являє собою клінічно й генетично гетерогенну групу спадкових захворювань, обумовлених мутаціями в генах, локалізованих на X хромосомі, що приводять до порушення інтелектуального розвитку. X-зчеплена інтелектуальна недостатність веде до глибокої інвалідності внаслідок важкого ураження ЦНС.

Синдром X-ламкої хромосоми або синдром Мартіна-Белл, виділений в окрему нозологічну одиницю у 1979 році, є найбільш розповсюдженою після синдрому Дауна формою ІН спадкової природи [26, 93, 97]. Синдром успадковується за X-зчепленим домінантним типом з варіюючою експресивністю та неповною пенетрантністю (80% у чоловіків і 30% у жінок) [93, 97, 98].

При цитогенетичному обстеженні хворих були отримані дані, що синдром Мартіна-Белл пов'язаний з існуванням фолат-чутливого ламкого сайту в області Xq 27.3 – FRAXA (Fragile site, X chromosome, A site), звідки і походить назва даного

захворювання – синдрому ламкої X хромосоми [93, 97, 98]. Завдяки молекулярно-генетичним дослідженням захворювання був відкритий ген *FMRI*, мутації в якому призводять до розвитку синдрому, та новий вид мутації – динамічна мутація, яка характеризується експансією нуклеотидів і, відповідно, новий механізм успадкування [99, 100]. Було показано, що кількість тринуклеотидних CGG-повторів в 5'-нетрансльованій області гена *FMRI* є поліморфним в нормальній популяції людини і варіює від 6 до 52 повторів. Виходячи з кількості CGG-повторів, були визначені основні категорії мутацій: 1/повна мутація, при якій у хворих з синдромом ламкої X-хромосоми виявили множинну ампліфікацію CGG-повторів, більш, ніж 230 копій, 2/премутація, коли кількість цих повторів варіює від 50 до 230 CGG-одиниць [101]. Повна мутація майже завжди супроводжується гіперметилуванням CpG-острівців промотора гена *FMRI*, внаслідок чого практично повністю припиняється експресія цього гена у осіб чоловічої статі. Окрім експансії CGG-повторів описані інші типи мутацій (делеції та заміни основ) в гені *FMRI*, що призводять до різного ступеня фенотипічної експресії синдрому Мартіна-Белл [102-105]. Також було показано, що до 53% жінок, що мають повну мутацію, є розумово відсталими [106]. Частота даного захворювання сягає 1 на 1500 новонароджених хлопчиків і 1 на 2500 дівчат [107, 108]. Затримка розвитку психомоторних функцій та ІН – найбільш важливі клінічні ознаки синдрому Мартіна-Белл. Коефіцієнт інтелекту (IQ) у хворих хлопчиків варіює в границях помірної ІН, від 30 до 55 [109, 110].

Активна робота над з'ясуванням ролі гена *FMRI* в патогенезі ІН та успіхи в визначенні генних мереж, до яких залучений цей ген (зокрема – Rho ГТФазний сигнальний шлях), дозволили наблизитися до розробки ефективної терапії синдрому Мартіна-Белл [111-113]. За допомогою генної терапії вдалося досягти відновлення структури клітин мозку, а також нормалізації поведінки у мишей з синдромом Мартіна-Белл [113]. Було виведено лінію мишей з синдромом Мартіна-Белл, що були одночасно носіями дефектного варіант гена *PAK* (P21-активована

кіназа), який спричинював порушення синтезу фермента, що проявляється через місяць після народження [113]. У новонароджених мишей відзначалися характерні ознаки синдрому Мартіна-Белл, які зникали або істотно зменшувалися через місяць після народження, тобто в період, коли відбувалося блокування фермента РАК [113]. Дослідження мозку тварин показало нормалізацію будови і числа дендритів, а також відновлення нормального функціонування синапсів [113]. Застосовувати генетичну терапію для лікування дітей з синдромом Мартіна-Белл не обов'язково. Ліки можна створити на основі одного з відомих у даний час інгібіторів фермента РАК, який є одним з ефекторів Rho ГТФазного сигнального шляху.

Іншим прикладом X-зчепленого захворювання, пов'язаного з порушенням розвитку ЦНС є синдром Ретта. Синдром Ретта – X-зчеплене домінантне захворювання, що зустрічається майже виключно у дівчат з частотою 1:10000-15000, проявляючись у вигляді важкої ІН, аутизму, а також епілепсії [114-116]. В даний час цей синдром розглядається в якості найбільш поширеної причини X-зчепленої ІН у дівчат. Етіологія захворювання пов'язана з делеціями локусу Xq28 або мутаціями гена *MECP2*, що локалізований в даному локусі [114-117]. Ген *MECP2* складається з 4 екзонів і кодує метил-СрG-зв'язуючий білок 2 [117, 118]. Цей білок відіграє ключову роль у епігенетичній регуляції експресії генів ЦНС. Мутації в гені *MECP2* відповідають за 90-95% випадків розвитку класичного синдрому Ретта і 40-60% випадків атипових форм синдрому Ретта [118-120]. У гені описано близько 800 мутацій, більшість з яких є онуклеотидними замінами і локалізовані в 3 і 4 екзонах. Дев'ять точкових мутацій (R168X, R270X, R255X, T158M, R306C, R294X, R133C, R106W, L386fs) є найбільш частими – 60-70% випадків, близько 10% мутацій – це невеликі делеції (20-150 п.н.) в карбокси-термінальному сегменті гена *MECP2*, великі перебудови, що захоплюють цілі екзони або навіть весь ген спричинюють 7,5% атипових випадків та 37 % класичних форм синдрому Ретта [120-125]. Синдром Ретта теж є генетично гетерогенним синдромом. У літературі описано велику кількість випадків захворювання, при яких

не було виявлено мутацій гена *MECP2*, не зважаючи на повну відповідність діагностичним критеріям CP [126-131]. Крім мутації гена *MECP2* у індивідів з атиповими формами CP були виявлені мутації і в інших генах. Серед них- мутації в гені *FOXP1* (forkhead box protein G1), що локалізований на 14 хромосомі (14q12), специфічні функції якого ще не визначені [126-128]. Передбачається, що цей ген може відігравати значиму роль у процесі розвитку мозку і регуляції активності гена *MECP2* [126, 127, 132]. У дівчаток з подібною на синдром Ретта клінічною картиною виявлені мутації гена *CDKL5* (cyclin-dependent kinase-like 5), що кодує однойменний ядерний білок, який експресується в клітинах ЦНС і, імовірно, бере участь у тих же внутрішньоклітинних процесах, що і *MECP2* [129, 130]. Мутації гена *CDKL5*, локалізованого на 11 хромосомі (11p13), знаходять у 28% дівчат з раннім проявом (у віці до 6 міс) інфантильних спазмів [118, 133]. Крім цього епігенетичні зміни, які спостерігаються при синдромі Ретта і проявляються у вигляді реплікації ДНК X хромосоми специфічного характеру, свідчать про наявність патогенетичного механізму (генної мережі), властивого цьому захворюванню.

Загалом, на сьогодні ідентифіковано більше 100 генів X-хромосоми, мутації в яких ведуть до порушень інтелекту [12, 92, 93]. Група захворювань, що класифікуються як X-зчеплена розумова відсталість, налічує близько 200 моногенних нозологічних форм. Сумарна частота даних захворювань варіює від 1:1000 до 1:560 в загальній популяції [92-95]. Слід зазначити, що лише обмеженому числу X-зчеплених форм ІН властиві чітко окреслені симптомокомплекси, що веде до труднощів їх ідентифікації. До теперішнього часу не вдається встановити вклад XLID серед хвороб дитячого віку, що призводять до порушення інтелекту. Не зважаючи на велику кількість робіт, присвячених клінічним та молекулярно-біологічним аспектам патології, недостатньо розроблені критерії та стратегії її диференціальної діагностики серед недиференційованих форм ІН.

Відсутність достатніх відомостей про патогенез на молекулярному рівні захворювань даної групи ускладнює розробку способів їх діагностики та терапевтичної корекції. Таким чином, ідентифікація генів та генних мереж, залучених в патогенез ІН має ключове значення для вирішення проблем діагностики X-зчеплених та інших форм ІН.

*1.2.3.2. Rho ГТФазний сигнальний шлях в патогенезі інтелектуальної недостатності.* ГТФази родини Rho беруть участь у регуляції реорганізації актинового цитоскелету [134, 135]. Родина Rho ГТФаз включає 23 сигнальних білки і складається з шести підродин, що відіграють ключову роль в регуляції роботи багатьох актин зв'язуючих білків, а також мікротрубочок [134, 135]. Найбільш добре вивченими членами цієї родини є Rac1, Cdc42 та RhoA білки. У нервовій системі Rho ГТФази є важливими регуляторами морфогенезу та росту дендритних відростків нейронів, міграції аксонів, а також передачі синаптичних сигналів [136-140]. Враховуючи ці життєво важливі функції, очевидно, що гени, які кодують білки, залучені до Rho сигналіngu, є детермінаторами деяких форм інтелектуальної недостатності. Кілька генів детермінаторів несиндромальної X-зчепленої ІН кодують білки, які беруть участь в клітинному сигналіngu через Rho ГТФази або низхідні ефектори цього сигнального каскаду: *OPHN1*, *PAK3*, *ARHGEF6* та *FGD1* [136, 141-]. Олігофренін 1 (*OPHN1*) – перший ідентифікований Rho-асоційований ген ІН, що кодує Rho-GAP (активууючий ГТФази білок – GTPase activating protein) білок, який негативно регулює RhoA, Rac1 та Cdc42 в нейронах [142]. Всі мутації в гені *OPHN1*, виявлені на сьогодні (3 нонсенс мутації, 1 сплайс мутація, 3 делеції і 1 інсерція), призводять до втрати функції продукту [136, 141, 142]. Ген *PAK3* кодує p21-активовану кіназу 3, що є членом родини серин/треонінових протеїнкіназ PAK, які є низхідними ефекторами для Rac/Cdc42 Rho ГТФаз [136, 141, 143-146]. *PAK3* на високому рівні експресується в різних регіонах головного мозку [114, 145]. Різні однуклеотидні мутації в гені *PAK3* були виявлені у пацієнтів з несиндромальною X-зчепленою ІН [144-146]. Ген *ARHGEF6*, також відомий як  $\alpha$ PIX або Cool-2, є

третім Rho-асоційованим геном детермінатором несиндромальної X-зчепленої ІН [136, 141]. Ген *ARHGEF6* кодує фактор обміну гуанінових нуклеотидів (GEF – guanine nucleotide exchange factor) для Cdc42/Rac1, який також взаємодіє з РАК кіназами [147]. Перша мутація в цьому гені була ідентифікована у пацієнта чоловічої статі, який був носієм реципрокної X;21 транслокації з точкою розриву, розташованою між 10-м і 11-м екзонами гена *ARHGEF6* [148]. Крім того, мутації виявлені в першому інтроні цього гена [149]. Мутації в гені фаціогенітальної дисплазії 1 (*FGD1*) є причиною синдрому Аарскога-Скотта [150]. Ген *FGD1* теж кодує фактор обміну гуанілових нуклеотидів, який специфічно активує Cdc42 [151]. При активації Cdc42, FGD1 білок стимулює формування фібробластами філоподій, елементів цитоскелету, що беруть участь в клітинному сигналінгу, адгезії і міграції [151]. Через Cdc42 білок FGD1 також активізує JNK-сигнальний шлях, який регулює апоптоз, ріст та диференціацію клітин. Нонсенс- або стоп-мутаціями в гені *OCRL1*, що кодує фосфатидилінозитол-4,5-біфосфат-5-фосфатазу – білок активуючий ГТФази Rac, є причиною синдрому Лоу [152-153]. Ген картовано на довгому плечі X-хромосоми (Xq25-q26) [154]. Всі ідентифіковані мутації є рецесивними, тому захворювання проявляється у чоловіків, у той час, як жінки зазвичай є носіями. Зустрічається з частотою 1:500000 новонароджених [154]. Клітини пацієнтів з синдромом Лоу, мають дефекти утворення первинних цілій. Дані дефекти обумовлені недостатністю фосфатидилінозитол-4,5-біфосфат-5-фосфату, що є критичним метаболітом, залученим в везикулярний транспорт цілій [155].

Мутації Rho-асоційованих генів також пов'язують з аутосомними формами ІН. Наприклад, синдромом Вільямса, причиною якого є делеції ділянки 7-ї хромосоми (7q11.23), що містить ген *LIMK1*, який кодує важливий нисхідний ефектор RhoA, Rac і Cdc42 ГТФаз [156]. Іншим прикладом Rho-асоційованого гена, пов'язаного з аутосомною формою ІН є ген *MEGAP* (mental-disorder-associated GAP), який кодує білок активуючий ГТФази Cdc42 та Rac1. Ген *MEGAP* локалізований на хромосомі

3p25 [157]. *MEGAP* був ідентифікований як ген, всередині якого знаходилася точка розриву при збалансованій транслокації X;3 у пацієнтки з тяжкою ІН [141, 157]. Також спостерігається делеція гена *MEGAP* у пацієнтів з 3p- синдромом [157].

Останні дослідження показали, що Rho сигналінг також відіграє важливу роль у патогенезі синдрому ламкої X-хромосоми. Продукт гена *FMR1* – FMRP є РНК-зв'язуючим білком, який негативно регулює транскрипцію мРНК і концентрується в дендритних шипиках [158, 159]. В дендритних шипиках FMRP (fragile X mental retardation protein) зв'язується з цитоплазматичними FMRP взаємодіючими білками (CYFIPs), які є ефекторами Rac залежного сигналінгу [111, 141, 160]. Було висунуто припущення, що при взаємодії з активованим Rac, один з цих білків (CYFIP1) дисоціює від FMRP, що дозволяє локалізовано регулювати синтез білків [111, 141, 160]. Ці молекулярні взаємодії можуть забезпечити розуміння зв'язку між залежною від синаптичної активності трансляцією білка та ремоделюванням цитоскелету, що лежить в основі формування та підтримки дендритних шипиків, а отже і синапсів.

Слід також відзначити, що дефекти Rho ГТФазного сигнального шляху (RAC/PAK/LIMK/cofilin сигналінгу) були також пов'язані з когнітивним дефіцитом при хворобі Альцгеймера [141, 143, 161]. Дослідження останніх років показали, що Rho сигналінг може впливати на рівень амілоїдогенних пептидів (Abeta42), який лежить в основі патогенезу хвороби Альцгеймера, шляхом регуляції процесинга білка-попередника амілоїду (APP) [141, 143, 161].

*1.2.3.3. ERK/MAP-кіназний сигнальний шлях в патогенезі інтелектуальної недостатності.* ERK/MAP-кіназний шлях відповідає за передачу регуляторних сигналів факторів росту. Цей шлях є особливо цікавим, оскільки він є залученим до регуляції деяких типів синаптичної пластичності [16, 162]. Гени (*RPS6KA3* та *SYNGAP1*), що кодують білки ERK/MAPK шляху та його ефектори, також були ідентифіковані в якості детермінаторів несиндромальної інтелектуальної недостатності [16, 163-]. Мутації в гені *RPS6KA3*, який кодує рибосомальну S6 кіназу 2 (RSK2), що є низхідним ефектором ERK/MAP-кіназного сигнального

шляху, є причиною синдрому Коффіна-Лоурі [163-165]. Синдром Коффіна-Лоурі є Х-зчепреним домінантним захворюванням, що супроводжується важкою ІН [163, 164]. Гетерозиготні одонуклеотидні мутації в гені *SYNGAP1*, що локалізований на 6-й хромосомі (6p21.32), є причиною несиндромальної аутосомно-домінантної ІН [166-169]. Ген *SYNGAP1* кодує Ras ГТФазу активуючий білок, який в основному локалізований в дендритних шипиках пірамідальних нейронів неокортексу і відіграє значну роль в процесах регуляції синаптичної пластичності та розвитку когнітивних функцій [16, 169].

*1.2.3.4. Білки, які містять цинковий палець в патогенезі інтелектуальної недостатності.* Білки, що містять цинковий палець (ZNF – zinc finger proteins), до складу яких входить структурний домен Kruppel-асоційований бокс (Kruppel associated box – KRAB), що є найбільшою родиною транскрипційних факторів, представлені тільки у тетрапод [170]. Міссенс і нонсенс-мутації в низці генів цих білків залучені в патогенез Х-зчеплених (*ZNF41, ZNF81, ZNF674, ZNF711*) [171-174] і аутосомних (*ZNF592, ZNF589*) [175, 176] форм несиндромальної інтелектуальної недостатності. Крім того, порушення функціонування генів підродини ZNF-KRAB протеїнів може бути причиною порушення інтелектуального розвитку при 19q13.11 мікрделеційному синдромі [177]. Цей регіон містить п'ять генів, чотири з яких є ZNF генами, що належать до підродини ZNF-KRAB: *ZNF302, ZNF181, ZNF599* і *ZNF30*. ZNF-KRAB білки, як було показано, мають вирішальну роль у процесах регуляції транскрипції, приймаючи участь в ДНК-залежній репресії транскрипції, шляхом зв'язування з ко-репресорами [178]. Гени ZNF-KRAB протеїнів експресуються на високому рівні у різних тканинах людини, приймаючи участь в процесах ембріонального розвитку, проліферації та диференціації клітин, апоптозу, малігнізації та регуляції клітинного циклу [178]. Тим не менш, попри їх поширеність, більшість генів ZNF-KRAB протеїнів залишаються повністю невивченими з точки зору їх функцій.



### 1.3. Стратегії пошуку нових генів-кандидатів інтелектуальної недостатності

На сьогодні відомо, що у мозку дорослої людини експресується біля 84% всіх генів [179]. З урахуванням тих генів, які експресуються лише в ембріогенезі, можна стверджувати, що майже весь геном задіяний у процес розвитку та функціонування ЦНС. Проте для більшості генів, що експресуються в ЦНС, функціональна роль досліджена недостатньо, або ще зовсім не встановлена.

Виходячи з наведеної вище інформації, за останнє десятиріччя докладені величезні зусилля по пошуку та вивченню генів, залучених у розвиток та функціонування ЦНС. В даний час накопичено значну кількість даних про асоціацію геномних реорганізацій та мутацій (поліморфізмів) цілої низки генів з патогенезом захворювань, пов'язаних з порушенням роботи ЦНС. Впровадження нових молекулярних та молекулярно-цитогенетичних технологій повногеномного скринінгу дозволяє виявляти в осіб з ІН нові субмікроскопічні геномні аберації та генні мутації. Тому більшість сучасних стратегій картування генів-кандидатів ІН та інших патологій, пов'язаних з порушенням розвитку та функціонування ЦНС, ґрунтуються на використанні подібних технологій (повноекзомне та повногеномне секвенування, повногеномна порівняльна гібридизація або array-CGH, повногеномний пошук асоціацій або GWAS – genome-wide association study) [3, 16, 56, 61, 63, 95, 180-182]. Але ключовим етапом залишається уніфіковане клінічне, клініко-генеалогічне, цитогенетичне та молекулярно-генетичне обстеження, в ході якого відбирають родини (ядерні), в яких хворі пробанди мають рідкісні фенотипи: несиндромальна та синдромальна розумова відсталість та/або вади розвитку головного мозку, вроджені вади розвитку, тощо. На перших етапах лабораторно-генетичного аналізу, використання рутинних молекулярно-генетичних та цитогенетичних методів дозволяє виключити великі хромосомні перебудови, біохімічні дефекти і відомі моногенні спадкові синдроми, що проявляються порушенням інтелектуального розвитку. Також проводиться аналіз геномних

ділянок, в яких локалізовані CNV, асоційовані з вже відомими мікрodelеційними / мікродуплікаційними синдромами, а також субтеломерних геномних реорганізацій в хромосомних ділянках, перебудови в яких також асоційовані із ІН.

Наступним кроком в найбільш продуктивних підходах до пошуку нових генів-кандидатів, що широко використовується в багатьох геномних проектах, є дослідження патогенних геномних реорганізацій типу CNV та повногеномне секвенування у хворих з ІН. Оскільки на перших етапах відбувається диференціювання відомих генетичних чинників, асоційованих з ІН, то подальший аналіз у відібраних групах пацієнтів дозволяє виявити нові генні мутації та хромосомні ділянки, реорганізації в яких асоційовані із вперше описаними синдромальними та несиндромальними формами ІН, картувати геномні локуси та за результатами біоінформатичного аналізу ідентифікувати нові гени-кандидати порушень розвитку та функціонування різних систем організму людини і, в першу чергу, нервової системи. Біоінформатичний аналіз результатів секвенування та геномних послідовностей в хромосомних ділянках перекривання виявлених мікрodelецій / мікродуплікацій у поєднанні із порівняльним аналізом фенотипових порушень у пацієнтів-носіїв цих перебудов дадуть змогу виявити спільні клінічні особливості та прокартувати геномні локуси і індивідуальні гени-кандидати, відповідальні за ці порушення, що дозволить ідентифікувати нові генетичні чинники рідкісних синдромів, пов'язаних з ІН та картувати локуси, асоційовані із специфічними ознаками клінічного фенотипу.

Подальша стратегія ідентифікації генів, що кодують білки, залучені до процесів розвитку та функціонування ЦНС, полягає в дослідженні мутантних варіантів, виявлених в ході повногеномного секвенування та виокремлених в ході біоінформатичного аналізу геномних послідовностей, виявлених хромосомних перебудов, в когортах хворих з ІН та популяціях здорового населення з метою аналізу асоціацій досліджуваних мутантних варіацій з ІН, тобто з порушенням розвитку та функціонування ЦНС. Важливим етапом в ідентифікації таких генів-

кандидатів може бути аналіз профілів їх експресії в тканинах головного мозку в нормі та при патології. Вагомими доказами патогенності мутацій досліджуваних генів також можуть стати результати порівняльного аналізу третинної структури нормальних та мутантних білків, отриманої за допомогою комп'ютерного моделювання.

Один з найбільших проектів з досліджень у цьому напрямку, називається "Конектом людини" (Human Connectome Project) [183]. Конектомом, за аналогією з геномом, називають повну структуру зв'язків у нервовій системі. Метою проекту є найповніший опис зв'язків між нейронами людського мозку і виявлення можливих кореляцій між структурою нейронних мереж і розумовими здібностями, а також поведінкою конкретної людини. Даний проект стартував у 2009 році, розрахований на п'ять років і фінансується Національним Інститутом Здоров'я США. У проекті беруть участь 1200 дорослих добровольців – пари близнюків, а також їх брати і сестри із приблизно 300 сімей. Магнітно-резонансна томографія дає можливість оцінити структуру зв'язків, високощільна електроенцефалографія дозволяє отримати дані про функціональну мережу. Так для кожного учасника складаються карти анатомічних і функціональних зв'язків мозку, а до 2018 року планується повне секвенування їх геномів. Порівняння геномів і конектомів ідентичних близнюків і неідентичних сибсів, ймовірно, принесе нову інформацію про внесок конкретних генів у формування та функціонування нервової системи.

Надзвичайно перспективними є дослідження геномних реорганізацій та мутацій (поліморфізмів) можливих генів-кандидатів при нейродегенеративних та нейропсихічних патологіях. В останні роки розроблені новітні методи повногеномного скринінгу, які дозволяють картувати геномні локуси та ідентифікувати гени-кандидати різних патологічних станів. Найбільш масштабним з досліджень у цьому напрямку є міжнародний проект «Геноміка мозку» (Brain Genomics Superstruct Project) [184]. Мета даного проекту полягає у вивченні ефектів генів на структуру і функціонування мозку.

В рамках міжнародного проекту CHERISH (№ 223692) 7-ої рамкової програми "Поліпшення діагностики розумової відсталості у дітей Центральної Східної Європи та Центральної Азії за допомогою генетичної характеристики та біоінформатики/статистики" у відділі геноміки людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України проводилося дослідження пацієнтів із різними формами інтелектуальної недостатності (ІН). Була створена база клінічних даних та біобанк ДНК пацієнтів з ІН з різних регіонів України і членів їх родин. В ході проекту було проведено аналіз CNV з використанням повногеномної порівняльної гібридизації (array-CGH) та визначено патогенні геномні реорганізації у частини пацієнтів. Для решти пацієнтів, у яких не було виявлено патогенних CNV, найбільш імовірною причиною ІН можна передбачати наявність мутацій, що спричинюють моногенні форми патології або є факторами спадкової схильності до розвитку мультифакторних форм ІН. З метою дослідження таких мутацій і, зокрема, генетичних чинників ІН з аутосомно-рецесивним типом успадкування в рамках проекту було проведено повноекзомне секвенування двох неідентичних братів з родини № 094, у яких спостерігалися ознаки несиндромальної ІН. За результатами цього аналізу були визначені мутації в п'яти різних генах. Ці дані стали підґрунтям для досліджень, проведених в ході даної роботи – пошуку генів-кандидатів патогенезу моногенних форм та факторів спадкової схильності до розвитку мультифакторних форм ІН.

Ідентифікація нових генів, залучених у розвиток нейронів і когнітивних функцій, забезпечить подальше розуміння молекулярних і фізіологічних механізмів розвитку і функціонування головного мозку. Це у найближчому майбутньому забезпечить краще розуміння геномних порушень і молекулярних механізмів, що лежать в основі ІН, що може в підсумку призвести до суттєвого поліпшення діагностики та розробки персоналізованих методів лікування даної патології.

## РОЗДІЛ 2

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

## 2.1. Матеріали дослідження

Матеріалом дослідження були зразки крові індивідів з ідіопатичною інтелектуальною недостатністю та членів їх родин надані медичними закладами України: Державною установою "Інститут педіатрії акушерства та гінекології НАМН України" (м. Київ), Кримським медико-генетичним центром обласної лікарні (м. Сімферополь), обласним медико-генетичним кабінетом Закарпатської обласної клінічної лікарні ім. Андрія Новака (м. Ужгород), Хмельницьким міським перинатальним центром (м. Хмельницький), Державною установою "Інститут спадкової патології АМН України" (м. Львів), обласним центром медичної генетики обласної клінічної лікарні (м. Полтава). Контрольна група, яка представляла загальну популяцію України, складалась з неспоріднених донорів крові з різних регіонів України. Крім того було обстежено членів родини, що складається з двох хворих сибсів (хлопчиків) з несиндромальною ІН і подібними психоневрологічними симптомами та здорових неспоріднених батьків. Дану родину було обрано нами з числа 95 родин з інтелектуальною недостатністю для проведення секвенування екзому хворих сибсів. Участь в дослідженні та забір крові проводились за умови інформованої згоди.

Для перевірки та дизайну послідовностей олігонуклеотидних праймерів користувалися базою даних NCBI з використанням пошукової системи BLAST SEARCH (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Олігонуклеотидні праймери для ампліфікації послідовностей досліджуваних генів *EPHA1*, *PUS3*, *ZNF527*, *SCEL*,

*Sborf223* та *LIF* були синтезовані у відділі геноміки людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України на олігосинтезаторі ASM 800 DNA SYNTHESIZER “BIOSSET” (Росія), методом твердофазного фосфоамідитного синтезу.

*Реактиви.* Для проведення ПЛР використовували термостабільну Taq-ДНК-полімеразу, ампліфікаційний буфер та набори дезоксинуклеозидтрифосфатів виробництва фірми “Thermo Scientific”.

В роботі були використані: протеїназа К виробництва фірми “Thermo Scientific”; додецилсульфат натрію (ДСН або SDS), сахароза, TRITON X-100<sup>TM</sup>, етилендіамінтетраамінооцтова кислота (ЕДТА), гідроксиметилметилен-амін (Тріс), агароза, акриламід (АА), бісакриламід, N,N,N,N'-тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД), бромід етидія, бромфеноловий синій, ксиленціанол виробництва фірми “SIGMA”; 50 та 100 Base-Pair Ladders виробництва “GE HealthCare Bio-Sciences AB” (США). Решта реактивів – вітчизняного виробництва (фірми «Макрохім») марок ОСЧ та ЧДА.

*Робочі розчини,* які використовувались для досліджень:

- буфер TE – 10мМ Тріс-НСl; 1мМ ЕДТА;
- 5x TBE буфер – 0,89М Тріс-НСl; 0,89М Н<sub>3</sub>ВО<sub>3</sub>; 20 мМ ЕДТА;
- сахарозний буфер – 0,32 М сахароза; 5мМ Тріс-НСl; 1x TRITON X100; 0,1М MgCl<sub>2</sub>;
- протеїназний буфер – 10мМ Тріс-НСl; 1мМ ЕДТА (рН 8,0); 100 мМ NaCl;
- ампліфікаційний буфер для ПЛР – комерційний 10 кратний розчин, який містить (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, оптимізований для ПЛР із використанням Таq-полімерази;
- буфер для нанесення проб ДНК на агарозний гель – 0,1% бромфеноловий синій, 0,1% ксиленціанол, 30% гліцерол.

## 2.2. Клініко-генеалогічний аналіз та формування вибірок.

В рамках даної роботи було обстежено дві групи неспоріднених індивідів з різних регіонів України. Зокрема, було обстежено членів родини № 094, що складається з двох хворих сибсів (хлопчиків) з несиндромальною ІН і подібними психоневрологічними симптомами та здорових неспоріднених батьків. Дану родину було обрано з числа 95 родин з інтелектуальною недостатністю для проведення секвенування екзому хворих сибсів в рамках міжнародного проекту CHERISH (№ 223692) – "Поліпшення діагностики розумової відсталості у дітей Центральної Східної Європи та Центральної Азії за допомогою генетичної характеристики та біоінформатики/статистики" (2009-2012 рр.).

Згідно з основними правилами біоетики при використанні людини в якості об'єкту дослідження, нами була отримана інформована згода на проведення даного дослідження від усіх досліджуваних індивідів, та було введено номенклатуру зразків ДНК, яка включала числовий код.

Дослідження групи пацієнтів з інтелектуальною недостатністю. Для включення в дослідження проекту CHERISH були відібрані пацієнти з недиференційованими формами інтелектуальної недостатності (IQ між 20 і 70). Збір та аналіз інформації про хворих відбувався за розробленим в ході проекту протоколом у відповідності до загальноприйнятих світових критеріїв діагностики порушень інтелектуальної функції, який складався з кількох розділів: сімейний анамнез і родовід, історія протікання вагітності і неонатального періоду у пробанда, дані про розвиток дитини, антропометричні дані, дані загального клінічного обстеження та аналізу фенотипу, дані психопатологічного та патопсихологічного обстежень, дані інструментальних обстежень (в т.ч. КТ і ЯМР-обстеження головного мозку, ЕЕГ, ЕХО-ЕГ та ін.), дані цитогенетичних, молекулярно-генетичних і біохімічних обстежень.

Дослідження інтелектуальних функцій пробандів проводили за адаптованим для мешканців України методом Векслера (WISC) [15, 185].

Для всіх пацієнтів з ІН проводили цитогенетичне дослідження на матеріалі крові. На початковому етапі дослідження проводили класичним напівмікроскопічним методом з наступним каріотипуванням (G-banding, 500-800 bend). Аналізували 29 метафазних пластинок. Для виключення найбільш частоті моногенної X-зчепленої форми ІН (синдрому ламкої X-хромосоми) всім пробандам з ІН проведено молекулярно-генетичне дослідження кількості CGG-повторів у промоторних ділянках генів *FMR1* та *FMR2* згідно з описаними раніше методиками [186, 187]. У пробандів чоловічої статі також був проведений аналіз метилювання в локусах *FRAXA*, *FRAXE*, *FRAXF* з використанням метилчутливої ПЛР згідно з описаним раніше протоколом [188].

За результатами проведеного аналізу у відділі геноміки людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України була створена база клінічних даних та біобанк ДНК пацієнтів з ІН з різних регіонів України і членів їх родин. Було зібрано 95 сімей.

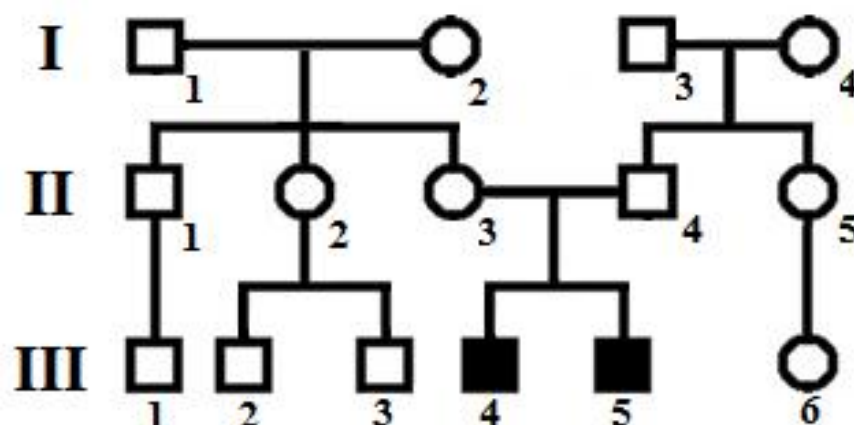
Відбір сімей здійснювався за наступними критеріями:

- наявність в сім'ї одного і більше хворих з недиференційованою ІН ( $IQ \leq 70$ );
- відсутність у хворих відомих хромосомних мутацій або клінічних синдромів (синдром Дауна та ін.) і генетично обумовлених біохімічних порушень (фенілкетонурія та ін.);
- відсутність у хворих генних мутацій в локусах *FRAXA*, *FRAXE*, *FRAXF*.

Також в ході проекту було проведено аналіз CNV з використанням повногеномної порівняльної гібридизації (array-CGH) високої роздільної здатності 44K (44000 зондів) і 105K (105000 зондів) та визначено патогенні геномні реорганізації у частини пацієнтів. Дане дослідження проводиться в організаціях-партнерах проекту в ЄС (на Кіпрі та в Італії).



Для решти пацієнтів, у яких не було виявлено патогенних CNV, найбільш імовірною причиною ІН можна передбачати наявність мутацій, що спричинюють моногенні форми патології або є факторами спадкової схильності до розвитку мультифакторних форм ІН.



**III:4**



**III:5**

Рис. 2.1. Родовід родини № 094 та фотографії пацієнтів: III:5 – пацієнт 1; III:4 – пацієнт 2

З когорти пацієнтів з ідіопатичною інтелектуальною недостатністю, у яких не виявлено патогенних CNV, було обрано родину №094, що складається з двох

хворих сибсів чоловічої статі (пацієнт 1 – пробанд і пацієнт 2 – його старший брат) з несиндромальною ІН та здорових неспоріднених батьків, для проведення секвенування екзому сибсів. Дану родину було обрано нами у відповідності до критеріїв відбору для пошуку генів-детермінаторів моногенних форм ІН: наявність 2 і більше хворих членів родини, наявність здорових сибсів або батьків, несиндромальна ідіопатична ІН ( $IQ \leq 50$ ), попередньо встановлений за результатами аналізу родоводів (рис. 2.1) тип успадкування (аутосомно-рецесивний), відсутність патогенних CNV за результатами агау-CGH скринінгу.

Для обох пацієнтів проводили дослідження вмісту амінокислот і ацилкарнітину в сухій плямі крові методом тандемної маспектрометрії. Для цього використовували систему рідинної хроматографії-маспектрометрії, яка складається з рідинного хроматографа Dionex Ultimate 3000 і маспектрометра AB Sciex 2000 (Applied Biosystems, США). Тест-системи, використані для аналізу – MassChrom Reagent Kit for the LC-MS / MS analysis of Amino Acids and Acylcarnitines from Dried Blood (Chromsystems, Німеччина).

Пацієнт 1 – шестирічний хлопчик (2009 року народження), який народився в строк (на 40-му тижні вагітності), маючи масу тіла при народженні 4000 г і оцінку 7 за шкалою Апгар. Затримку розвитку діагностували з моменту народження – затримка в розвитку моторики, гіпотонія та конвульсії новонароджених. Сидіти почав у віці 20 місяців, ходити – на 29 місяці життя. Епілептичний синдром проявився у віці 12 місяців і характеризувався міоклоніями повік з абсансами (синдром Дживонса), що було підтверджено результатами електроенцефалограми (ЕЕГ) та магнітно-резонансної спектроскопії (МРС). Проведене у віці 5 років неврологічне обстеження показало затримку психомоторного розвитку, важку затримку мовного розвитку (вживає лише кілька слів), апатію і IQ 50. Зріст пацієнта становив 110 см (75 центиль), у той час, як вага була 14 кг (3 центилі) і окружність голови – 49,5 см (10 центиль). Фізикальне обстеження виявило доліхоцефалію, гіпотелоризм,

готичне піднебіння, арахнодактилію і часткову синдактилію I-II пальців руки, гіпермобільність суглобів та кіфосколіозом 1 ступеню, гіпереластичну бліду шкіру з чітким судинним малюнком шкіри чола, грудей і рук.

Пацієнт 2 – чотирнадцятирічний хлопчик (2001 року народження), який народився в строк (на 40-му тижні вагітності), маючи масу тіла при народженні 3700г і оцінку 8 за шкалою Апгар. Затримку розвитку діагностували з 9 місяців від народження – затримка в розвитку моторики та гіпотонія новонароджених, а також складнощі з харчуванням в перші місяці життя. Сидіти почав у віці 12 місяців, ходити – на 26 місяці життя. З семи років розпочалися втрата навиків та порушення психомоторного розвитку У віці 9-10 років почали проявлятися стереотипні рухи, агресивна поведінка по відношенню до інших, порушення сну: безсоння протягом приблизно 1 року (3-5 днів поспіль), поліпшення стану- при прийомі мелатоніну. Проведене у віці 14 років неврологічне обстеження показало затримку психомоторного розвитку, важку затримку мовного розвитку (вживає лише кілька слів), гіперактивність і IQ 48. Зріст пацієнта становив 153 см (10 центиль), у той час, коли вага була 38 кг (3 центилі) і окружність голови – 53 см (25 центиль). Фізикальне обстеження виявило доліхоцефалію, гіпотелоризм, готичне піднебіння, арахнодактилію і часткову синдактилію I-II пальців руки, гіпермобільність суглобів та сколіозом 1 ступеню, гіпереластичну бліду шкіру з чітким судинним малюнком шкіри грудей, ознаки дисплазії сполучної тканини.

Батько 1981 року народження, неврологічне обстеження не виявило порушень інтелекту – IQ 120. Фізикальне обстеження виявило брахіцефалію, гіпотелоризм, готичне піднебіння, гіпермобільність суглобів, ознаки дисплазії сполучної тканини. Мати 1980 року народження, з правильною статурою та рисами обличчя, неврологічне обстеження не виявило порушень інтелекту – IQ 120.

З метою пошуку факторів спадкової схильності розвитку інтелектуальної недостатності з когорти пацієнтів з ІН, у яких не виявлено патогенних CNV, нами було відібрано 65 неспоріднених пацієнтів з легкою несиндромальною ІН, яка зазвичай проявляється як мультифакторно зумовлена. У дану групу увійшло 24 (36.9 %) індивіди жіночої статі та 41 (63.1 %) – чоловічої статі, у віці від 3-х до 19-ти років.

В якості контрольної була сформована група з неспоріднених донорів крові з різних регіонів України (середній вік  $37 \pm 3,79$  років), яка представляла загальну популяцію України. У дану групу увійшло 250 індивідів: 131 (52.4 %) чоловічої статі і 119 (47.6 %) жіночої статі.

### 2.3. Методи дослідження

**2.3.1. Виділення ДНК з лімфоцитів периферійної крові.** ДНК виділяли за допомогою стандартного методу – шляхом гідролізу лізатів клітин протеїназою К з наступною фенольною екстракцією. Для виділення ДНК із крові спочатку до 1 об'єму холодної крові для лізису лейкоцитів додавали 7-9 об'ємів холодного буферу, що містить 5 мМ  $MgCl_2$ , 10 мМ Трис-НСІ (рН 8,0), 1% Тритон Х-100, 0,32 М сахарозу, й осаджували ядра шляхом центрифугування при 2500 об./хв. за  $4^\circ C$  протягом 15 хвилин. Осад ядер ресуспендували в 460–1840 мкл (при виділенні ДНК із 3–10 мл крові) буфера, що містить 100 мМ NaCl, 10 мМ Трис-НСІ, 1 мМ ЕДТА (рН 8,0). Далі додавали 10%-вий розчин додецилсульфату натрію до кінцевої концентрації 0,5% і протеїназу К до кінцевої концентрації 100 мкг/мл. Після інкубації лізатів ядер протягом 4 годин при  $55^\circ C$  чи 12-16 годин при температурі  $37^\circ C$  здійснювали їх депротеїнізацію шляхом послідовної екстракції фенолом (рН 8,0), сумішшю рівних об'ємів фенолу і хлороформу та хлороформом до зникнення інтерфазі після центрифугування. Осад ДНК отримували додаванням 2-2,5 об'ємів холодного етилового спирту,

центрифугували, промивали 70% етиловим спиртом, підсушували і розчиняли в 0,1 ТЕ (10 мМ Трис-НСІ, 1 мМ ЕДТА, рН 8,0) [189].

Якість препаратів ДНК визначали за спектральними характеристиками та шляхом електрофорезу в 0,6%-ному агарозному гелі. Спектральні характеристики та концентрацію ДНК визначали на приладі ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop, США) у діапазоні  $\lambda_{220} - \lambda_{300}$ . Відношення оптичної щільності, визначеної відповідно при  $\lambda_{260}$  та при  $\lambda_{280}$ , показує чистоту препарату ДНК по відношенню до білків і має вкладатися в рамки між 1,9 та 2,0. Значення менше 1,8 вказує на наявність у розчині значної кількості білків, а вище 2,0 – на домішки РНК. Деякі білки крім поглинання при  $\lambda_{280}$  мають максимум при  $\lambda_{230}$ , до того ж, поглинання в цьому діапазоні хвиль відбувається також для багатьох інших органічних сполук. Таким чином, відношення  $\lambda_{260}/\lambda_{230}$  для нативної ДНК без органічних домішок має складати 2,0. Найчастіше проби ДНК крім домішок білків мають залишки фенолу, який поглинає при  $\lambda_{270}$ . Відношення  $\lambda_{260}/\lambda_{270}$  для ДНК без фенолу становить 1,2. Домішки, які мають спектр поглинання вищий за 300 нм візуалізуються у видимому світлі, при цьому розчин ДНК стає непрозорим.

**2.3.2. Секвенування екзонів генів *EPHA1*, *PUS3*, *ZNF527*, *SCEL* та *C6orf223*.** З метою перевірки достовірності результатів повноекзомного секвенування двох хворих сибсів з обраної нами родини та аналізу генотипів їх батьків було проведено секвенування за Сенгером продуктів ПЛР генів *EPHA1*, *PUS3*, *ZNF527*, *SCEL* та *C6orf223*. Послідовності праймерів, використаних в даному аналізі для ампліфікації екзонів досліджуваних генів в місцях локалізації ідентифікованих в ході повноекзомного секвенування мутацій, та відповідні температурні режими проведення реакцій представлені в табл. 2.1.

Після проведення ампліфікації продукти реакції фракціонували у 2% агарозному гелі. Досліджувані фрагменти виділяли із гелю і очищували за допомогою набору Qiaex II kit (Qiagen, Hilden, Німеччина) згідно протоколів

фірми-виробника. Пряме секвенування було проведено з використанням комерційного набору „ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits”.

Всі послідовності ДНК були проаналізовані в обох напрямках на приладі ABI Prism 3110 Genetic Analyser (Applied Biosystem). Встановлені послідовності нуклеотидів порівнювалися за допомогою програми Invitrogen Vector NTI Advance 10 із відповідними опублікованими послідовностями генів *EPHA1*, *PUS3*, *ZNF527*, *SCEL* та *Sborf223*, які наведені у базі даних NCBI.

**2.3.3. Дизайн праймерів та оптимізація умов для проведення специфічної полімеразної ланцюгової реакції.** Аналіз послідовностей праймерів на специфічність проводили з використанням комп’ютерної бази даних BLAST SEARCH (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) за умов сканування геномної послідовності ДНК досліджуваного гена. Основні вимоги до дизайну були наступні: висока специфічність; якомога нижчий вміст гуанідину в послідовності; однакові температури плавлення для кожного з членів пари праймерів.

Оптимальні умови проведення полімеразної ланцюгової реакції – склад реакційної суміші та температурно-часовий режим – дозволяють отримати достатню для детекції кількість високо специфічного продукту ампліфікації ДНК *in vitro*. З метою створення таких умов проведення реакції нами здійснювався аналіз послідовностей ДНК-матриць для ПЛР та відповідних фланкуючих праймерів. Критичними параметрами для реакційної суміші були: концентрація іонів магнію, кількість ферменту – термостабільної Taq-полімерази та концентрація праймерів. Критичними параметрами температурних режимів були: температура відпалювання праймерів на ДНК-матриці та температура синтезу. Важливими параметрами часових режимів були: співвідношення періоду денатурації до періоду відпалювання праймерів та оптимальний час фази синтезу, а також загальна кількість повних циклів реакції.

**Послідовності олігонуклеотидних праймерів та температурні режими,  
використані для проведення ПЛР**

Ген	Локус	Послідовності олігонуклеотидних праймерів	Відпалювання t °C
EPHA1	c.1891G>A	5'-GAACGCAATGGTTCAAAGAGG-3' - «forward» 5'-TGTGGCTGAAGCCTTATGTG-3' - «reverse»	63
	rs11768549	5'-AGGGCCAGGACCCAGTGGGGTCAGC-3' - «forward» 5'-CATGTGCTCTGATGCTGTCC-3' - «reverse»	55
PUS3	c.212A>G	5'-CTGGAGCAAGAGGTGCAAAGACT-3' - «forward» 5'-ACCTGTCCAAAGGCACTAACTCC-3' - «reverse»	63
ZNF527	rs386809049	5'-TТАCTCAACATCAGACCACTCATTT-3' - «forward» 5'-TACATTCATAAGGTTTCTCCCCAA-3' - «reverse»	55
SCEL	rs141416270	5'-ATTATTTTCAGACATGTGGGTGGG-3' - «forward» 5'-GCACAGCAATTACGCCTGACACC-3' - «reverse»	57
	c.1135_1136 insA	5'-TTCCATTTTTATTTATGATGTTT-3' - «forward» 5'-TAACATTTTCAGATGTGAGGTAGC-3' - «reverse»	57
Sborf223	rs146391418 та rs138503303	5'-AGTCCCTTCTTCGCGGCTCTGC-3' - «forward» 5'-TAGAGCGCATTAGCCGTGCCCT-3' - «reverse»	57

**2.3.4. Ампліфікація ДНК *in vitro*.** Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в автоматичному режимі на термоциклерах “2720 Thermal Cycler” фірми “Applied Biosystems” а також iCycler виробництва фірми „BIO-RAD” (США).

Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила:

- Ампліфікаційний буфер (750 мМ Tris-HCl (pH 8.8 при 25°C), 200 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 0.1% (v/v) Tween<sup>TM</sup> 20) – 1× ;
- MgCl<sub>2</sub> – 2,5 мМ;
- бичачий сироватковий альбумін – 170 мкг/мл;
- dNTP – 400 мкМ кожного типу;
- ДНК – 100–300 нг;
- термостабільна ДНК-полімераза – 0,5 одиниць активності;
- олігонуклеотидні праймери – по 5 мкМ кожного.

Далі вміщували пробірки в ампліфікатор, використовували оптимізовані режими проведення полімеразної ланцюгової реакції, описані в табл. 2.1, 2.2 та 2.3. Після ампліфікації зразки охолоджували при кімнатній температурі.

Якщо зразки не підлягали аналізу відразу після закінчення полімеразної ланцюгової реакції, то їх зберігали при +4<sup>0</sup>С.

**2.3.5. Аналіз точкових мутацій с.1891G>A в гені *EPHA1* та с.212A>G в гені *PUS3* методом сайт-специфічної полімеразної ланцюгової реакції.** Метод оснований на тому, що Taq полімераза не може ампліфікувати послідовність ДНК при наявності невідповідності між матрицею ДНК та 3'-кінцем відповідного праймера [190].

Суть методу полягає в паралельному проведенні двох ПЛР, для кожної з яких застосовується пара праймерів – комплементарних послідовності «дикого типу» та мутантній послідовності. Сайт з заміною в алель-специфічних праймерах знаходиться на 3'-кінці. При певних умовах, серед яких найбільш важливими є концентрація іонів магнію та концентрація праймерів, наявність сайту негомологічного спарювання в 3'-області праймера перешкоджає початку синтезу ДНК. В результаті, при аналізі зразка без мутації спостерігається ампліфікація лише з парою праймерів, комплементарних послідовності «дикого типу»; в результаті аналізу гетерозиготного носія мутації, спостерігається



ампліфікація алелів з мутацією та дикого типу; у випадку гомозиготної мутації ампліфікується лише послідовність з мутантними праймерами.

Сайт-специфічну ПЛР (або алель-специфічну ПЛР) в даній роботі проводили в автоматичному режимі на термоциклерах "Perkin-Elmer Cetus" (США), "2720 Thermal Cycler" фірми "Applied Biosystems" як описано вище [191].

Таблиця 2.2

**Послідовності олігонуклеотидних праймерів, використані для проведення аналізу точкових мутацій с.1891G>A в гені *EPHA1* та с.212A>G в гені *PUS3***

Ген	МНЗ	Послідовності олігонуклеотидних праймерів	Відпалювання t °C
<i>EPHA1</i>	с.1891G>A	5'-GAACGCAATGGTTCAAAGAGG-3' – «common» 5'-GCTGATGGTGGACACTGTCATtG-3' – «wild type» 5'-GCTGATGGTGGACACTGTCATtA-3' – «mutant»	63
<i>PUS3</i>	с.212A>G	5'-CTGGAGCAAGAGGTGCAAAGACT-3' – «forward» 5'-GACACGTAGCCCTAAGAATAGCCCTa-3' – «wild type» 5'-CCTGGTATCCCCAGCCCATAc-3' – «mutant» 5'-ACCTGTCCAAAGGCACTAACTCC-3' – «reverse»	63

Для проведення аналізу точкових мутацій с.1891G>A в гені *EPHA1* та с.212A>G в гені *PUS3* нами було розроблено методики з використанням сайт-специфічної ПЛР. Для проведення сайт-специфічної ПЛР відповідної нуклеотидної послідовності гена *EPHA1* використовували 3 специфічних

олігонуклеотидних праймери, один спільний та два специфічних для кожного з алельних варіантів – 1891G та 1891A. Аналіз точкової мутації с.212A>G в гені *PUS3* проводили, використовуючи по парі специфічних олігонуклеотидних праймерів для кожного з алельних варіантів – 212A та 212G. З метою підвищення специфічності роботи праймерів та уникнення формування димерів в олігонуклеотидні послідовності були внесені некомплементарні основи.

Отримані послідовності праймерів наведені в таблиці 2.2. З метою визначення оптимальної температури відпалювання праймерів, при якій не відбувається утворення неспецифічних продуктів ампліфікації досліджуваних послідовностей, нами було проведено ПЛР контрольних зразків з градієнтом температури відпалювання праймерів (градієнт температур 54-65°C).

Враховуючи оптимальну температуру відпалювання праймерів, було оптимізовано температурно часові умови ампліфікації:

- початкова денатурація – 5 хв. при 95°C

30 циклів:

- денатурація ДНК – 30 сек. при 95°C,
- відпалювання праймерів – 30 сек. при 63°C,
- елонгація – 30 сек. при 72°C.

фінальна елонгація – 5 хв. при 72°C

ПЛР продукти аналізували в 2%-ному агарозному гелі. Розмір ампліфікованих фрагментів відповідної послідовності гена *EPHA1* становить 204 п.н. При ампліфікації послідовностей гена *PUS3* утворюються ПЛР продукти з розмірами 320 п.н., 193 п.н. та 172 п.н.

**2.3.6. Аналіз однонуклеотидних замін в генах *EPHA1*, *ZNF527* та *LIF* методом аналізу поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів.** Даний метод аналізу нуклеотидної послідовності, оснований на ампліфікації *in vitro* фрагмента послідовності ДНК гена, що містить ділянку локалізації поліморфного варіанту з наступним гідролізом продукту ПЛР ендонуклеазою рестрикції, сайт

впізнання для якої з'являється або зникає в результаті мононуклеотидної заміни. У тих випадках, коли не вдається підібрати ендонуклеазу рестрикції для такого аналізу, використовується один з варіантів методу полімеразної ланцюгової реакції – метод наведення відповідного сайту рестрикції шляхом сайт-спрямованого мутагенезу за допомогою ПЛР із неповністю гомологічними нуклеотидній послідовності ДНК-матриці олігонуклеотидними праймерами. Аналіз послідовності досліджуваних генів на наявність сайтів впізнавання для ендонуклеаз рестрикції проводили з використанням програми Invitrogen Vector NTI Advance 10.

Таблиця 2.3

**Послідовності олігонуклеотидних праймерів, температурно-часові режими, використані для проведення ПЛР, та ендонуклеази рестрикції, використані для проведення аналізу ПДРФ**

Ген	Локус	Послідовності олігонуклеотидних праймерів	Відпалювання t °C	Ендонуклеази рестрикції
<i>EPHA1</i>	rs11768549	F 5'-AAAGGGCCAGGA CCCAGTGGGGTCAGC-3' R 5'-CATGTGCTCT GATGCTGTCC-3'	58 (5 циклів) 55 (30 циклів)	<i>KpnI</i>
	rs11767557	F 5'-GGGTCTTTCTCTT TAGTATGATGCTCC-3' R 5'-CAGACGCCAG AAGGGGAAAGA-3'	65 (5 циклів) 62 (25 циклів)	<i>RsaI</i>

## Продовження табл.2.3

<i>EPHA1</i>	rs11771145	F 5'-TGGATTTGCCTG TTCTTAAACTTTTT-3' R 5'-CTGAATCCACA CACAACCAAGGAA-3'	60 (5 циклів) 58 (25 циклів)	<i>DraI</i>
<i>ZNF527</i>	rs386809049	F 5'-TТАСТСААСАТС AGACCACTCАТТТ-3' R 5'-ТАСАТТСАТАА GGTTTCTCCССАА -3'	58 (5 циклів) 55 (30 циклів)	<i>NdeI</i>
<i>LIF</i>	rs929271	F 5'- GGGGACACAGA ААСААGGACAGGG-3' R 5'- ААGGGTCGGAT CTGAGAGAATGGG-3'	65 (5 циклів) 62 (25 циклів)	<i>HinfI</i>

Хоча ендонуклеази рестрикції в більшості випадків комплектуються концентрованими буферними розчинами, необхідність їх використання знижує технологічність процесу аналізу, так як додаються ще дві додаткові операції: переосадження продукту ПЛР та додавання концентрованого розчину, для якого потрібно провести розрахунок необхідного об'єму буферного розчину залежно від виходу в кожній окремій ПЛР. При виконанні серії аналізів такі процедури будуть вимагати додаткових витрат часу та реактивів. Тому ми вирішили спробувати проводити рестрикцію без використання додаткових буферів (безпосередньо в ПЛР суміші, що містить продукт ПЛР). Це можливо, оскільки склад реакційної суміші подібний до складу рекомендованих робочих буферних розчинів. Так рН реакційної суміші (7,8-8,0 при 37°C) та іонна сила відрізняються від таких для рекомендованого буферного розчину несуттєво.

Ми провели випробування на можливість проведення рестрикції без використання буферів для ендонуклеази рестрикції. Для цього паралельно провели

дві серії гідролізу: в першому випадку гідроліз проводили за звичайною схемою (з використанням буферу для ендонуклеаз рестрикції), в другому – без використання буфера. В обох реакційних сумішах спостерігали гідроліз ПЛР-продуктів за всіма наявними сайтами рестрикції. Такий результат можна пояснити тим, що, як уже зазначалося, відмінності в складі реакційної суміші та рекомендованого буфера незначні, та тим, що ендонуклеаза рестрикції бралася в невеликому надлишку, що компенсувало зниження активності ферменту.

Для проведення аналізу поліморфних варіантів досліджуваних генів *EPHA1*, *ZNF527* та *LIF* нами було розроблено методики з використанням ПЛР з наступним ПДРФ (поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів) аналізом. Послідовність праймерів, використаних в даному аналізі, температурні режими проведення реакцій та відповідні ендонуклеази рестрикції представлені в табл. 2.3.

З метою визначення оптимальної температури відпалювання праймерів, при якій не відбувається утворення неспецифічних продуктів ампліфікації досліджуваних послідовностей, нами було проведено ПЛР контрольних зразків з градієнтом температури відпалювання праймерів (градієнт температур 54-65°C). Враховуючи оптимальну температуру відпалювання праймерів, було оптимізовано температурно часові умови ампліфікації.

Ампліфікацію *in vitro* специфічної послідовності ДНК досліджуваних локусів проводили в автоматичному режимі, який складався із 2 стадій. Кожна стадія відбувалася в 3 етапи: денатурація – 94°C (30 с), відпалювання праймерів (30 с), елонгація – 72°C (30 с); при цьому на I стадії – 5 циклів температура відпалювання праймерів була вищою, для запобігання ампліфікації неспецифічних ПЛР-продуктів, а II стадія – 25-30 циклів із пониженням температури відпалювання (табл. 2.3). Успішність проведення ПЛР та відсутність контамінації реакційної суміші аналізували за допомогою електрофорезу в 1,5% агарозному гелі. У випадку успішного проведення ПЛР у

зразки додавали специфічні для кожної МНЗ ендонуклеази рестрикції в кількості 3 в.о.а та проводили рестрикцію протягом 12-16 годин при температурі 37°C. Продукти гідролізу ампліфікованих послідовностей аналізували за допомогою електрофорезу в 2% агарозному гелі або 8% поліакриламідному гелі.

**2.3.7. Електрофоретичне фракціонування фрагментів ДНК в агарозному гелі.** Для проведення електрофорезу готували 5-кратний TBE-буферний розчин (див. підрозділ 2.1.). Для електрофорезу використовували 1 кратний TBE-буферний розчин. Продукти ПЛР фракціонували в 1,5-2% агарозному або 8-10% поліакриламідному гелі та забарвлювали 1% розчином інтеркалюючого барвника етидіум броміду. ПЛР-продукти при нанесенні на гель змішували з розчином для нанесення на гель (див. підрозділ 2.1.) у співвідношенні 3:1 (ПЛР-продукт : розчин для нанесення). Електрофорез проводили на приладі фірми „HELICON” (Росія) при кімнатній температурі та напруженості електричного поля 10-15 В/см гелю до візуального розділення аналізованих фрагментів. Візуалізацію проводили на УФ-трансілюмінаторі виробництва фірми "Vilber Lourmat" (Австралія). Результати електрофоретичного розділення фрагментів ДНК реєстрували за допомогою фотографування гелю, забарвленого бромідом етидію, розміщеного на УФ-трансілюмінаторі, через жовтий фільтр в ультрафіолетовому світлі (довжина хвилі 260 нм) цифровою фотокамерою із роздільною здатністю матриці 5-10 мегапікселей.

**2.3.8. Використання біоінформатичних web-ресурсів та баз даних.** Пошук послідовностей проводили в базах даних нуклеїнових кислот на сайті Національного центру біотехнологічної інформації США (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Аналіз послідовності гена проводили з допомогою програми Invitrogen Vector NTI Advance 10. Програма дозволяє в інтерактивному режимі проводити пошук заданих послідовностей, що використовували для пошуку місць однонуклеотидних замін та підбору ендонуклеаз рестрикції для їх ідентифікації. Вбудований інструмент „PCR”, призначений для підбору ПЛР

праймерів до заданої послідовності, здійснює пошук праймерів із збалансованими параметрами, які можна окремо аналізувати на можливість утворення вторинних структур та визначати їх термодинамічні показники. Вбудований інструмент „Gel Display Window” – дозволяє проводити моделювання реального процесу розділення фрагментів в текстовій та графічній формі в агарозному чи акриламідному гелі, в залежності від попередньо заданих умов.

Перевірку специфічності праймерів проводили за допомогою програми BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), що розміщена на сайті Національного центру біотехнологічної інформації. Для обліку даних проаналізованих зразків з допомогою програми Microsoft Excel була створена база даних.

Біоінформатичний аналіз нуклеотидної послідовності досліджуваних генів та поліморфних варіантів проводили з використанням баз даних та інтернет-ресурсів GeneCards: The Human Gene Database (<http://www.genecards.org>), SNPinfo (<http://snpinfo.niehs.nih.gov/snpinfo/index.html>), PROMO ([http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo\\_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF\\_8.3](http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3)) та “1000 Genomes” (<http://browser.1000genomes.org/>).

Виявлені в ході повноекзомного секвенування мутації були проанотовані за допомогою програми ANNOVAR [192], та проведено порівняння з низкою спеціалізованих баз даних:

dbSNP Short Genetic Variations – база даних, що містить опис одонуклеотидних поліморфізмів, коротких інделей, коротких тандемних повторів (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>);

Reference Sequence (RefSeq) – анотація замін по цій базі даних дозволяє зрозуміти де, в кодуючій чи некодуючій частині генома, локалізована заміна, якщо в кодуючій, то в який ген потрапила заміна, в який екзон цього гена, і чи приводить заміна до зміни амінокислоти або до зсуву рамки зчитування [193];

PolyPhen та Sift – бази даних, що дозволяють спрогнозувати вплив несинонімічної мутацій на послідовність білка, кодовану геном, що містить заміну [194];

1000 Genomes, esp6500 – бази даних, що містять інформацію про частоти мінорних алелей, складених на підставі результатів секвенування геномів і екзомів в рамках проектів «1000 Genomes» (<http://www.1000genomes.org/>) і «NHLBI Grand Opportunity Exome Sequencing Project» (<https://esp.gs.washington.edu/drupal/>).

**2.3.9. Статистична обробка отриманих результатів.** Для розрахунку частот алелів та теоретично очікуваного розподілу генотипів, показників фактичної і теоретичної гетерозиготності, розрахунку показника  $\chi^2$  використовували пакет комп'ютерних програм “Genepop”[195]. В цьому ж програмному пакеті розраховували точний двосторонній критерій Фішера для виявлення значимих відмінностей між досліджуваними групами.

У дослідженнях типу “випадок-контроль” з метою оцінки сили асоціації генетичного чинника з патологією розраховували показник відношення шансів (OR) – співвідношення шансів прояву певного стану дихотомічної змінної в двох групах суб'єктів [196, 197]. Для розрахунку відношення шансів обчислювали вірогідність впливу факторів ризику (в даному випадку, поліморфного алеля або певного генотипу) в контрольній та дослідній групах:

Шанс знайти генетичний маркер в дослідній групі =  $(A(A+B))/(B(A+B)) = A/B$ ;

Шанс знайти генетичний маркер в контрольній групі =  $(C(C+D))/(D(C+D)) = C/D$ , де

A – кількість осіб з генетичним маркером в дослідній групі,

B – кількість індивідів без маркера в дослідній групі,

C – кількість осіб з генетичним маркером в контрольній групі,

D – кількість індивідів без маркера в контрольній групі.

Таким чином показник OR, розраховується за формулою:

$$OR = (A/B)/(C/D) = (A \times D)/(B \times C)$$



Інтерпретацію розрахованого показника проводили наступним чином. Якщо  $OR = 1$ , то досліджуваний маркер не впливає на прояв ознаки.  $OR > 1$  означає, що маркер асоційований з підвищеними шансами прояву ознаки, а  $OR < 1$ , навпаки – зі зниженими.

З метою оцінки точності  $OR$  розраховували 95% довірчий інтервал (ДІ). Чим більший інтервал, тим менша точність  $OR$ . Якщо в довірчий інтервал входила одиниця, показник  $OR$  вважали недостовірним. Слід мати на увазі, що саме по собі значення  $OR$  не є чутливим до розміру вибірки, однак від розміру вибірки залежить розмір стандартного відхилення та довірчий інтервал [197]. Розрахунок  $OR$  проводили з використанням програмного пакету “OpenEpi”[198].

Для того щоб з більшою точністю детектувати асоціацію генетичного чинника з патологічним станом, для кожного поліморфного маркера тестували три можливі генетичні моделі: домінуючу, рецесивну та адитивну. Для цього використовували тест Кохрана-Армітаджа, зважаючи на його нечутливість до відповідності розподілу генотипів рівновазі Харді-Вайнберга в групі “випадків”. В результаті, з трьох моделей обирали найбільш достовірну статистично, надаючи в спірних випадках перевагу адитивній моделі [196, 199].

**2.3.10. Множинне вирівнювання амінокислотних послідовностей.** Для аналізу консервативності амінокислотних сайтів було виконано множинне вирівнювання послідовностей білкових продуктів досліджуваних генів з використанням веб-сервісу програми Homologene на сайті Національного центру біотехнологічної інформації США (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) з налаштуваннями за замовчуванням. Послідовності білка ERHA1 людини і гомологічних білків інших видів еукаріот були знайдені у базі даних NCBI: EAL23789.1 (*Homo sapiens*), XP\_519451.2 (*Pan troglodytes*), XP\_004046443.1 (*Gorilla gorilla gorilla*), XP\_001090564.1 (*Macaca mulatta*), XP\_003134614.1 (*Sus scrofa*), XP\_004382475.1 (*Trichechus manatus latirostris*), NP\_001137567.1 (*Bos taurus*), XP\_005679613.1 (*Capra hircus*), XP\_001490110.4 (*Equus caballus*),

XP\_003983217.1 (*Felis catus*), XP\_539851.3 (*Canis lupus familiaris*), NP\_076069.2 (*Mus musculus*), NP\_001101328.1 (*Rattus norvegicus*), NP\_989691.1 (*Gallus gallus*), XP\_003202667.1 (*Meleagris gallopavo*) and XP\_005235457.1 (*Falco peregrinus*). Послідовності білка ZNF527 людини і гомологічних білків інших видів еукаріот, знайдені у базі даних NCBI: NP\_115829.1 (*Homo sapiens*), XP\_512625.3 (*Pan troglodytes*), XP\_004060716.1 (*Gorilla gorilla gorilla*), XP\_002801253.1 (*Macaca mulatta*), XP\_004284273.1 (*Orcinus orca*), XP\_004318350.1 (*Tursiops truncatus*), XP\_005692421.1 (*Capra hircus*), NP\_001070382.2 (*Bos taurus*), XP\_001494212.2 (*Equus caballus*), XP\_005616696.1 (*Canis lupus familiaris*), XP\_003997887.1 (*Felis catus*) and XP\_007119507.1 (*Physeter catodon*). Послідовності білків PUS3 та PUS1 людини і гомологічних білків інших видів еукаріот та прокариот, отримані з бази даних NCBI: NP\_079491.2 (*Homo sapiens*), NP\_112597.3 (*Homo sapiens*), XP\_001148378.1 (*Pan troglodytes*), XP\_001111887.1 (*Macaca mulatta*), NP\_075781.3 (*Mus musculus*), NP\_001101604.1 (*Rattus norvegicus*), XP\_536533.1 (*Canis lupus familiaris*), NP\_001029684.1 (*Bos taurus*), XP\_004948004.1 (*Gallus gallus*), NP\_956361.1 (*Danio rerio*), NP\_988969.1 (*Xenopus tropicalis*), NP\_611646.1 (*Drosophila melanogaster*), XP\_318500.4 (*Anopheles gambiae str.*), NP\_496062.3 (*Caenorhabditis elegans*), NP\_116655.1 (*Saccharomyces cerevisiae*), XP\_454596.1 (*Kluyveromyces lactis*) and P07649.1 (*Escherichia coli*). З бази даних NCBI також були отримані послідовності білків людини: ERHA2 (NP\_004422.2), ERHA3 (NP\_005224.2), ERHA4 (NP\_004429.1), ERHA5 (NP\_004430.4), ERHA6 (NP\_001265229.1), ERHA7 (NP\_000514.2), ERHA8 (NP\_001006944.1), ERHA10 (NP\_001006944.1), ERHB1 (NP\_004432.1), ERHB2 (NP\_004433.2), ERHB3 (NP\_004434.2), ERHB4 (NP\_004435.3), ERHB6 (NP\_004436.4), FGFR1 (NP\_056934.2), RET (NP\_066124.1), DDR1 (NP\_001189452.1), SRC (NP\_005408.1), ABL1 (NP\_009297.2), LYN (NP\_002341.1), BTK (NP\_001189452.1).

**2.3.11. Комп'ютерне моделювання просторової структури білків за гомологією.** Комп'ютерне моделювання просторової структури білків за гомологією проводили за допомогою web-ресурсу Swiss Model server (<http://swissmodel.expasy.org>). Моделі за гомологією просторової структури мутантного (p.R492Q) та дикого типу ектодоменів білка ERNA1 людини були отримані з використанням в якості «матриці» кристалічної структури ектодомена ERNA4 людини (PDB ID: 4BK4) [200]. Моделювання за гомологією просторової структури мутантного (p.G631R) та дикого типу кіназних доменів білка ERNA1 людини проводили, використовуючи в якості «матриці» кристалічну структуру кіназного домена ERNA3 (PDB ID: 2QOB) [201]. Моделювання за гомологією просторової структури мутантного (p.Y71C) та дикого типу каталітичних доменів білка PUS3 проводили, використовуючи в якості «матриці» кристалічну структуру каталітичного домену PUS1 – псевдоуридинсинтази (PDB ID: 4NZ6) [202].

## РОЗДІЛ 3

## РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Аналіз асоціації ідентифікованих в ході повноекзомного секвенування мутацій з патогенезом інтелектуальної недостатності в родині № 094.

В ході міжнародного проекту 7 Рамкової програми, CHERISH (№ 223692), було проведено секвенування екзому двох хворих сибсів (хлопчиків) з несиндромальною ІН і виявлено: генотип з мутантними варіантами с.1475G>A (rs11768549) та с.1891G>A (раніше не описана) в гені *EPHA1*; генотип з мутантними варіантами с.524C>T (rs141416270) та с.1135\_1136insA (раніше не описана) в гені *SCEL*; генотип з мутантними варіантами с.585G>T (rs146391418) та с.586C>T (rs138503303) в гені *Sborf223*; нову гомозиготну мутацію с.212A>G в гені *PUS3*; гомозиготну мутацію с.806\_808CAT>TGTGCA (rs386809049) в гені *ZNF527* у обох пацієнтів з родини № 094.

Середня «глибина читання» (average read depth) або перекриття при секвенуванні екзома була 61,62-кратною для пацієнта 1 і 89,54-кратною для пацієнта 2. При аналізі з використанням програми Genome Analysis Toolkit були відібрані тільки варіанти з, щонайменше, десятикратним перекриттям, і для яких частка рідів з кількома сайтами картування менша 10%. Мононуклеотидні заміни та інделі, які змінюють кодуєчі ділянки геному та канонічні сплайс-сайти були досліджені додатково і варіанти, які анотовані з частотою >1% в загальнодоступних базах даних, таких як dbSNP135 і базах даних проекту 1000 геномів, були виключені.

З метою перевірки достовірності результатів повноекзомного секвенування двох хворих сибсів та аналізу генотипів батьків нами було проведено секвенування за Сенгером продуктів ПЛР генів *EPHA1*, *PUS3*, *ZNF527*, *SCEL* та *Sborf223* (пункт 2.3.6).

В ході секвенування за Сенгером було встановлено, що обидва пацієнтів мають компаундний гетерозиготний генотип за двома несинонімічними мононуклеотидними замінами с.1475G>A (rs11768549) та с.1891G>A (раніше не описана) в гені *EPHA1*, в той час, як батько є гетерозиготним носієм заміни с.1891G>A, а мати – гетерозиготним носієм заміни с.1475G>A (рис. 3.1).

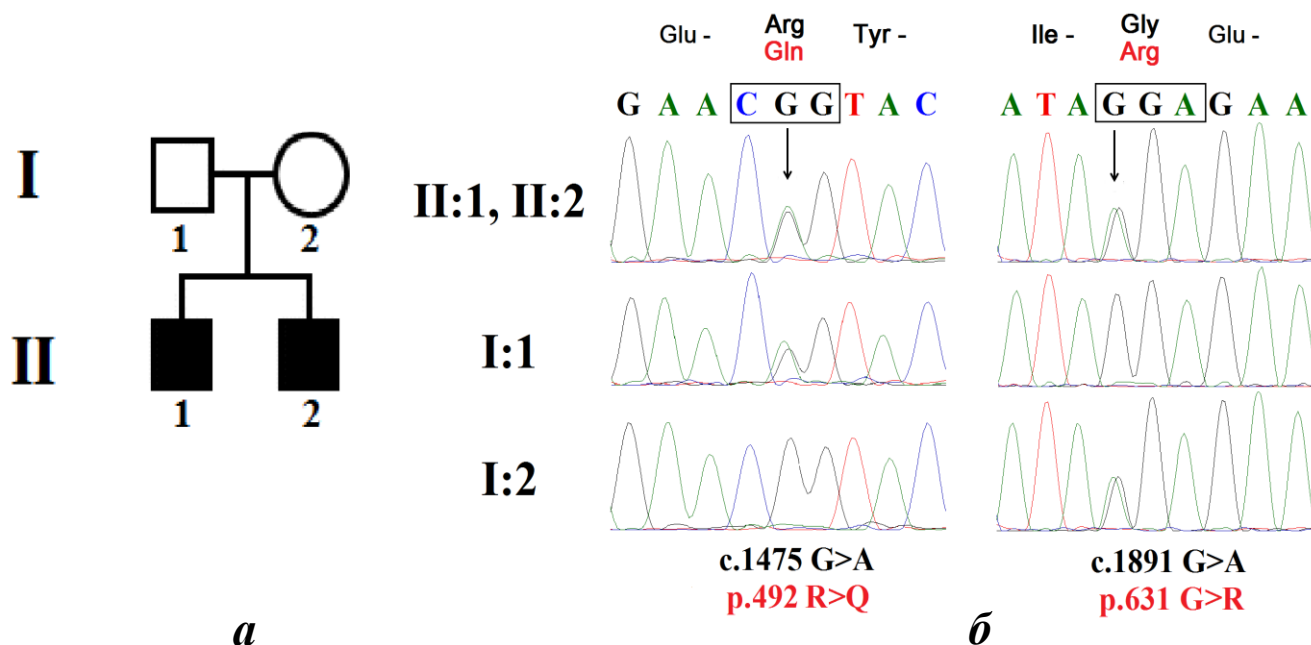


Рис. 3.1. Родовід (а) та хроматограма секвенування продуктів ПЛР гена *EPHA1* зразків ДНК (б) членів родини № 094: II:1 – пацієнт 1, II:2 – пацієнт 2, I:1 – батько, I:2 – матір

За результатами секвенування за Сенгером також було встановлено, що обидва хворих сибси є гомозиготними носіями заміни с.212A>G в гені *PUS3* (підтверджено результат екзомного секвенування), в той час, як батько хворих сиблінгів є гетерозиготним носієм заміни с.212A>G, а мати – гомозиготною за

алелем дикого типу 212A (рис. 3.2). Ми припускаємо, що в оогенезі матері відбулася *de novo* мутація с.212A>G.

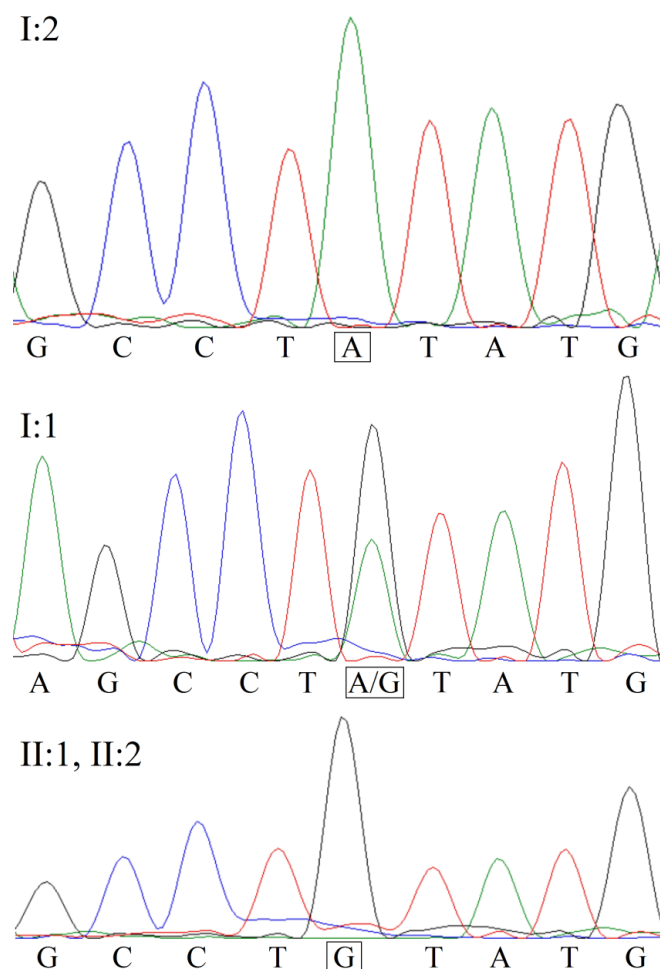


Рис. 3.2. Хроматограма секвенування продукту ПЛР локусу гена *PUS3* з заміною с.212A>G зразків ДНК членів родини № 094. II:1 – пацієнт 1, II:2 – пацієнт 2, I:1 – батько, I:2 – матір

Також було встановлено, що обидва пацієнтів мають гомозиготний генотип за заміною с.806\_808CAT>TGTGCA (rs386809049) в кодуючій частині гена *ZNF527* (підтверджено результат екзомного секвенування), в той час, як батько та мати хворих сиблінгів є гетерозиготними носіями інделі (рис. 3.3).

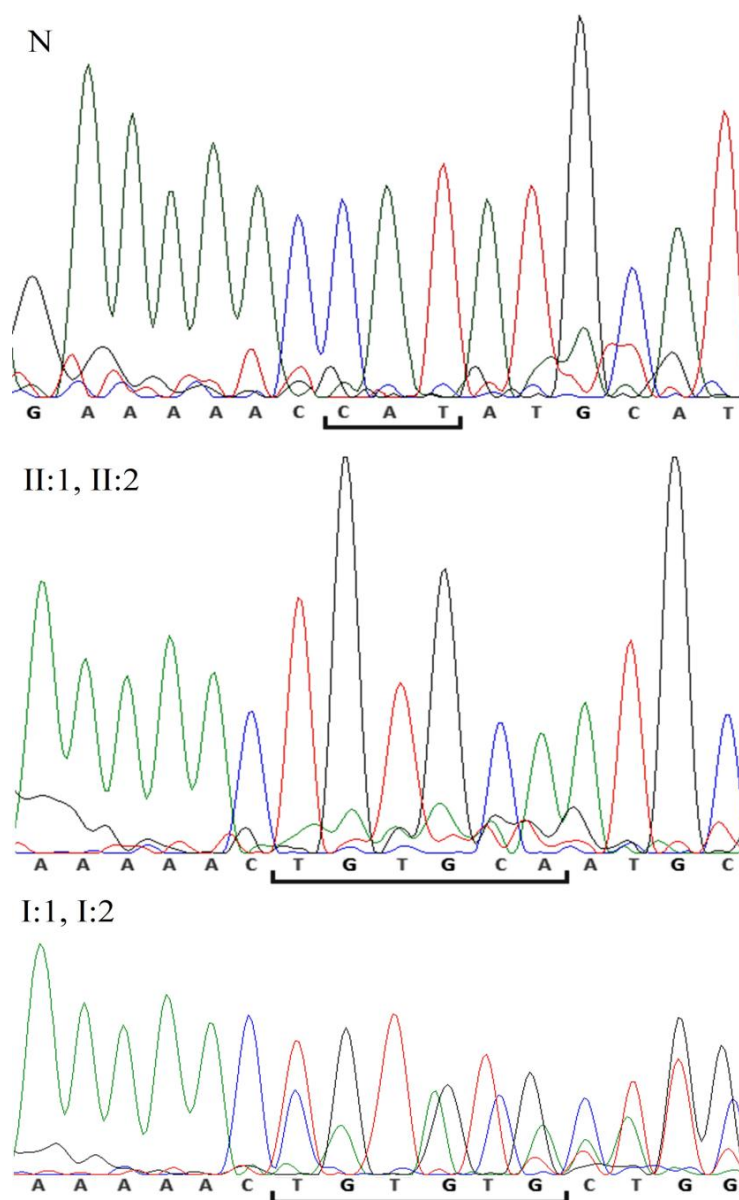


Рис. 3.3. Хроматограма секвенування продукту ПЛР локусу гена *ZNF527* з заміною с.806\_808CAT>TGTGCA зразків ДНК членів родини № 094. II:1 – пацієнт 1, II:2 – пацієнт 2, I:1 – батько, I:2 – матір, N – індивід, гомозиготний за алельним варіантом дикого типу CAT

Обидва пацієнти виявилися гетерозиготними носіями мононуклеотидних замін с.585G>T (rs146391418) та с.586C>T (rs138503303) в гені *Sborf223*, як і їх здоровий батько, в той час, як матір виявилася гомозиготною за алелями дикого типу за обома МНЗ с.585G>T та с.586C>T (рис. 3.4).

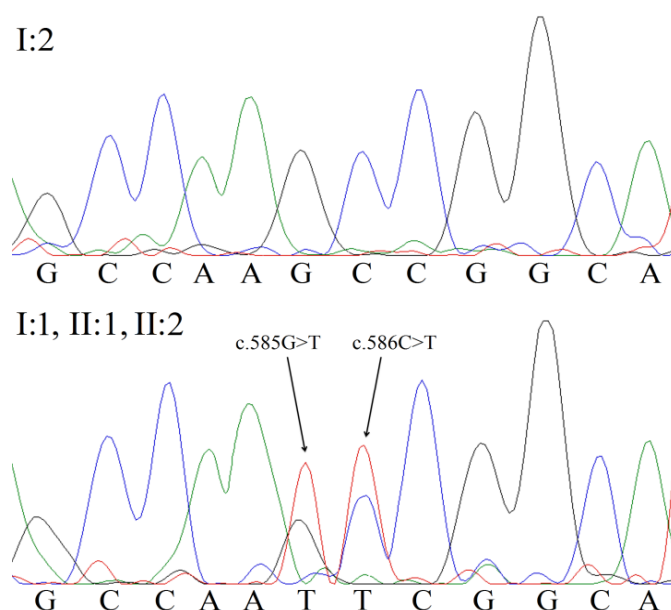


Рис. 3.4. Хроматограма секвенування продукту ПЛР гена *CBorf223* зразків ДНК членів родини № 094. II:1 – пацієнт 1, II:2 – пацієнт 2, I:1 – батько, I:2 – матір

Крім того було встановлено, що обидва пацієнтів з ІІ, як і їх здорова матір, є гетерозиготними носіями мононуклеотидної заміни c.524C>T – rs141416270 (рис. 3.5)

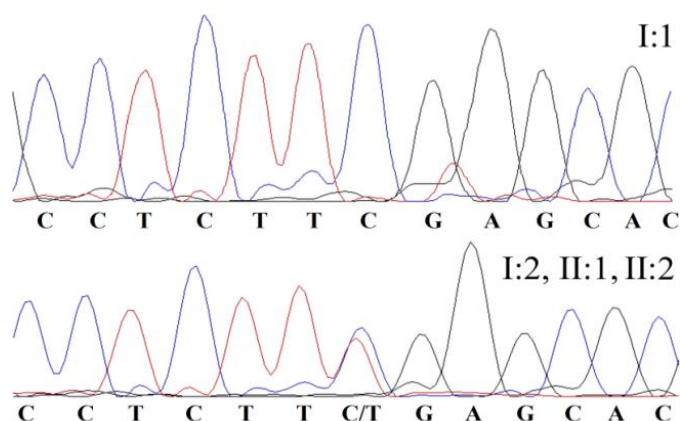


Рис. 3.5. Хроматограма секвенування продукту ПЛР локусу гена *SCEL* з мононуклеотидною заміною c.524C>T зразків ДНК членів родини № 094. II:1 – пацієнт 1, II:2 – пацієнт 2, I:1 – батько, I:2 – матір



та раніше не описаної мононуклеотидної інсерції c.1135\_1136insA (рис. 3.6) в гені *SCEL*, в той час, як батько виявився гомозиготним за алелями дикого типу за обома виявленими мутаціями.

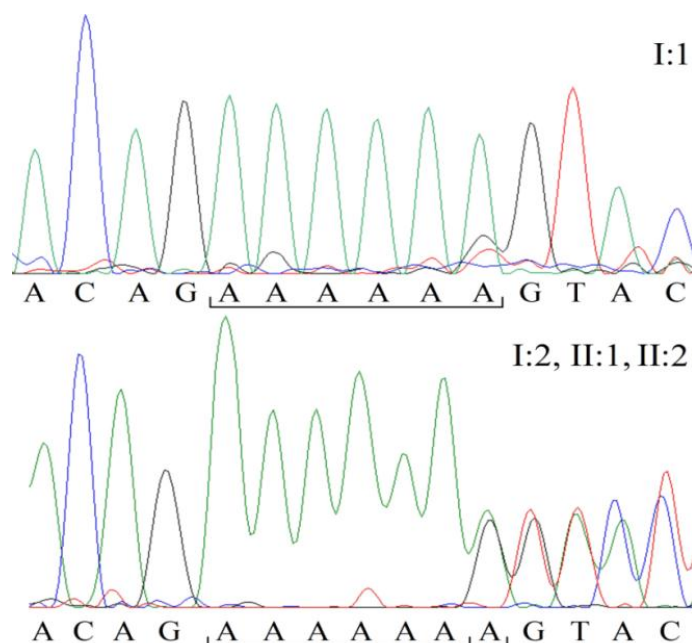


Рис. 3.6. Хроматограма секвенування продукту ПЛР локусу гена *SCEL* з мононуклеотидною інсерцією c.1135\_1136insA зразків ДНК членів родини № 094. II:1 – пацієнт 1, II:2 – пацієнт 2, I:1 – батько, I:2 – матір

Підсумовуючи дані, наведені в цьому підрозділі, зазначимо, що нами були проаналізовані та підтвержені результати секвенування екзому двох хворих сибсів (хлопчиків) з несиндромальною ІН та прогенотиповано їх батьків за ідентифікованими в ході повноекзомного секвенування мутаціями. Мононуклеотидна заміна c.524C>T (rs141416270) та мононуклеотидна інсерція c.1135\_1136insA в гені *SCEL*, а також мононуклеотидні заміни c.585G>T (rs146391418) та c.586C>T (rs138503303) в гені *Sborf223*, були виключені нами зі списку потенційних кандидатів, залучених в патогенез ІН. Адже виявилось, що

здорові батьки мають такі ж генотипи за зазначеними мутаціями, як і хворі сибси з ІН.

Мутації в генах *EPHA1* (с.1475G>A – rs11768549 та с.1891G>A – раніше не описана), *PUS3* (с.212A>G – раніше не описана), *ZNF527* (с.806\_808CAT>TGTGCA – rs386809049) є потенційними генами-кандидатами патогенезу у хворих з інтелектуальною недостатністю. Оскільки у обох пацієнтів ідентифікована мононуклеотидна заміна с.1475G>A (rs11768549) в 7 екзоні у компаунді з заміною с.1891G>A (раніше не описана) в 11 екзоні гена *EPHA1*, в той час, як здоровий батько є гетерозиготним носієм заміни с.1891G>A, а здорова мати – гетерозиготним носієм заміни с.1475G>A, ми припускаємо, що саме компаундний генотип з мутантними варіантами гена *EPHA1* с.1475G>A та с.1891G>A може бути детермінуючим фактором ІН у пацієнтів з обстеженої родини.

#### **Основні результати пункту опубліковані в роботах:**

1. *EPHA1* gene SNPs analysis in population of Ukraine / Gulkovskiy R.V., Chernushyn S.Y., Kravchenko S.A., Bychkova G.M., Livshits L.A. // *Biopolymers & cell.* – 2013. – 29(5). – P. 506-510.
2. *EPHA1* C1475T and C1891T polymorphisms in Ukrainian patients with idiopathic intellectual disability / R. V. Gulkovskiy, G.M. Bychkova, S.A. Kravchenko, N.V.Hryshchenko, S.Y. Chernushyn, M.Nõukas, M.Sauk, L. Milani, T. Pippucci, F. Balombo, C. Graziano, L. A. Livshits // *European Journal of Human Genetics*, Vol. 20 Suppl. 1, European human genetics conference 2013, June 8 – 11, 2013, Paris, France, P. 175
3. *EPHA1* as a new candidate gene for autosomal recessive non-syndromic intellectual disability / R. Gulkovskiy G. Volynets, S. Chernushyn, S. Kravchenko, L. A. Livshits // *European Journal of Human Genetics*, Vol. 22

- Suppl. 1, European human genetics conference 2014, May 31 – June 3, 2014, Milan, Italy, P. 153.
4. *EPHA1* as a new candidate gene for non-syndromic intellectual disability / R. Gulkovskyi G. Volynets, S. Chernushyn, S. Kravchenko, L. A. Livshits // *ACTA Biochimica Polonica*, Vol. 61 Suppl. 1, Abstracts of the BIO 2014 Congress, September 9-12, 2014, Warsaw, Poland, P. 120.
  5. *ZNF527* Gene rs386809049 Analysis in Population of Ukraine / Gulkovskyi RV, Chernushyn S.Y., Kravchenko S.A., Livshits L.A. // *Cytology and Genetics*. – 2015. – 49(4). – P. 240–244.
  6. Novel gene *PUS3* c.A212G mutation in Ukrainian family with intellectual disability / Gulkovskyi R.V., Chernushyn S.Y., Livshits L.A. // *Biopolymers and Cell*. – 2015. – 31(2). – P. 123–130.

### 3.2. Біоінформатичний аналіз мутацій, виявлених в ході повноекзомного секвенування в генах *EPHA1*, *PUS3*, *ZNF527*

На наступних етапах наших досліджень, з метою оцінки можливого патогенного впливу досліджуваних мутацій в генах *EPHA1*, *PUS3*, *ZNF527*, було здійснено аналіз консервативності амінокислотної послідовності білкових продуктів цих генів в місцях локалізації ідентифікованих мутацій, а також моделювання та порівняльний аналізу третинної структури нормальних та мутантних білкових продуктів відповідних генів.

Мутація c.806\_808CAT>TGTGCA в кодуючій послідовності гена *ZNF527* являє собою делецію трьох нуклеотидів – CAT та інсерцію шести – TGTGCA і призводить до заміни двох амінокислотних залишків гетероциклічного проліну в 269 положенні та ароматичного тирозину в 270 положенні на три – лейцин, цистеїн та аспарагін, що локалізовані в міждоменній області білка *ZNF527* (рис. 3.7). Продуктом гена *ZNF527* є білок з 609 амінокислот, до складу якого входить

KRAB-A домен та біля 11 класичних C2H2-типу ZNF доменів (рис. 3.7) [203, 204]. ZNF527 є членом великої родини транскрипційних факторів – Krueppel C2H2-type zinc-finger protein family але його функції досі нез'ясовані [203, 204].

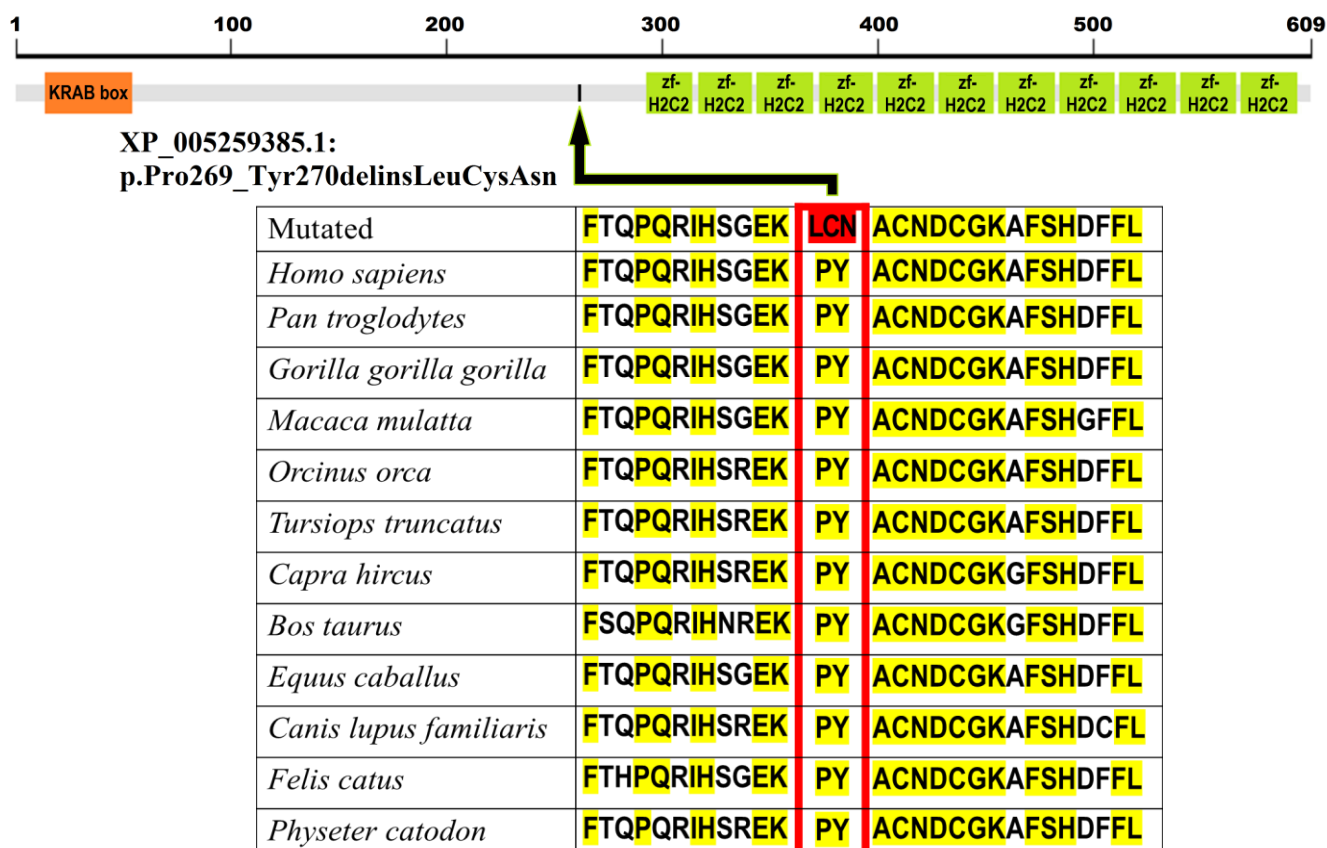


Рис. 3.7. Схематичне зображення структури білка ZNF527 (690 амінокислотних залишків) та аналіз результатів множинного вирівнювання амінокислотних послідовностей білків-ортологів. Схема доменів білка ZNF527 людини, які включають KRAB-A бокс (21-42 позиції амінокислот) та одинадцять цинк-пальцевих подвійних мотивів – ZF-H2C2 (285-593 позиції амінокислот) Консервативні амінокислотні положення представлені в жовтому кольорі, амінокислотні положення Pro269 та Tyr270 виділені червоним

Проведений нами аналіз відповідних сайтів білків-ортологів з використанням бази даних NCBI HomoloGene, показав, що амінокислотні позиції Pro269 і Tyr270 є консервативними у дванадцяти представлених видів ссавців, включаючи

людину, шимпанзе, горилу, макаку, косатку, дельфіна афаліну, козу, корову, коня, собаку, кішку і кашалота (рис. 3.7). Це вказує на можливу функціональну значимість цих залишків.

Мононуклеотидна заміна с.212A>G в кодуючій послідовності гена *PUS3* призводить до заміни ароматичної амінокислоти тирозину на сірковмісний цистеїн в 71 положенні (р.71Y>C), що локалізована в каталітичному домені псевдоуридинсинтази 3 людини. Аналіз результатів проведеного нами множинного вирівнювання амінокислотних послідовностей білків-ортологів показав, що тирозин у позиції 71 є високо-консервативним від *Escherichia coli* до людини (рис. 3.8).

Mutated	AFDFSAHGRRHVALRIA	<b>C</b>	MGWGYQGFASQE
<i>Homo sapiens</i>	AFDFSAHGRRHVALRIA	<b>Y</b>	MGWGYQGFASQE
<i>Pan troglodytes</i>	AFDFSAHGRRHVALRIA	<b>Y</b>	MGWGYQGFASQE
<i>Macaca mulatta</i>	AFDFSAHGRRHVALRIA	<b>Y</b>	MGWGYQGFASQE
<i>Mus musculus</i>	AFDFSAHGRRHVALKIA	<b>Y</b>	L GWGYQGFASQE
<i>Rattus norvegicus</i>	AFDFSAHGRRHVALKIA	<b>Y</b>	L GWGYQGFASQE
<i>Canis lupus familiaris</i>	AFDFSAHGRRHVALKIA	<b>Y</b>	L GWGYQGFASQE
<i>Bos Taurus</i>	AFDFSAHGQRHVALKIA	<b>Y</b>	L GWGYQGFASQE
<i>Gallus gallus</i>	PFDFAHGRRHVALRIA	<b>Y</b>	L GWGYQGFASQE
<i>Danio rerio</i>	PFDFAHPRRHVALRLA	<b>Y</b>	L GWQYQGFVAVQE
<i>Xenopus tropicalis</i>	AFDFSAHPKQHVALRLA	<b>Y</b>	L GWGYQGFASQE
<i>Drosophila melanogaster</i>	KFDWSSAHKRHVLLKIT	<b>Y</b>	F GWDYQGFACQE
<i>Anopheles gambiae str.</i>	PFDFAKCFKRHILLRFY	<b>Y</b>	L GWGYQGFVAAQE
<i>Caenorhabditis elegans</i>	TLDFLAHPRRKIAIQFF	<b>Y</b>	L GWEHDGLVQQP
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KFDFSKHNTRFIALRFA	<b>Y</b>	L GWNYNGLAVQK
<i>Kluyveromyces lactis</i>	EFDFSKYNTRFVAFKFA	<b>Y</b>	L GWNYNGLAIAQK
<i>Escherichia coli</i>	MSDQQQPPVYKIALGIE	<b>Y</b>	DGSKYYGWQRQN
<i>Homo sapiens</i>	AFDFSAHGRRHVALRIA	<b>Y</b>	MGWGYQGFASQE
<i>Homo sapiens PUS1</i>	-----SKRKIVLLMA	<b>Y</b>	SGKGYHGMQRNV

Рис. 3.8. Аналіз результатів множинного вирівнювання амінокислотних послідовностей білків-ортологів *PUS3*, консервативні амінокислотні положення представлені в сірому кольорі, амінокислотне положення Y71 виділене чорним

Це вказує на можливу функціональну значимість цього залишку. Для аналізу локалізації амінокислотної заміни p.71Y>C та виявлення можливих конформаційних змін третинної структури протеїну в залежності від наявності мутованих амінокислотних залишків, використавши кристалічну структуру каталітичного домену мітохондріальної PUS1 людини як шаблон [202], ми провели комп'ютерне моделювання за гомологією просторових структур нормального та мутантного каталітичних доменів білка PUS3 людини (рис. 3.9в і 3.9г). Мітохондріальна PUS1 людини, як і PUS3, належать до родини тРНК псевдоуридинсинтаз TruA і в основному локалізована в мітохондріях [202, 205].

З кристалічної структури білка TruA (бактеріального аналога PUS3) відомо, що активний сайт членів родини TruA утворюється чотирма високо-консервативними амінокислотними залишками (рис. 3.9а), включаючи каталітичний аспартат (D60 в TruA), два аргініни (R58 та R205) і тирозин (Y118) [206]. Ці залишки відповідають D146, R144, R295 та Y201 в послідовності PUS1 людини (рис. 3.9б) та D118, R116, R280 і Y195 в послідовності білка PUS3 людини (рис. 3.9в і 3.9г) [202, 206-209].

Тирозин в 71 положенні послідовності білка PUS3, відповідає Y18 бактеріальної TruA та Y92 – в послідовності білка PUS1 і також є ще однією високо-консервативною амінокислотою (рис. 3.8) [202, 206-209].

Як можна бачити з рис. 3.9в і 3.9г, заміна високо-консервативного ароматичного тирозину в 71 положенні на сірковмісний цистеїн, локалізована в безпосередній близькості від активного сайту білка PUS3 (~10Å від каталітичного аспартату) і може призвести до змін в конформаційній гнучкості та просторовій організації каталітичного домену. Тим не менш, ми все ще не можемо стверджувати, що мутація p.71Y>C може призвести до зміни псевдоуридилатсинтазної активності білка PUS3 людини.

Мононуклеотидна заміна c.1475G>A (rs11768549) в 7 екзоні гена *EPHA1* призводить до заміни амінокислоти аргініну на глутамін в 492 положенні



(р.492R>Q), що локалізована в фібронектиновому повторі III типу ектодомену білка EphA1 – Ephrin type-A receptor 1 (рис. 3.10).

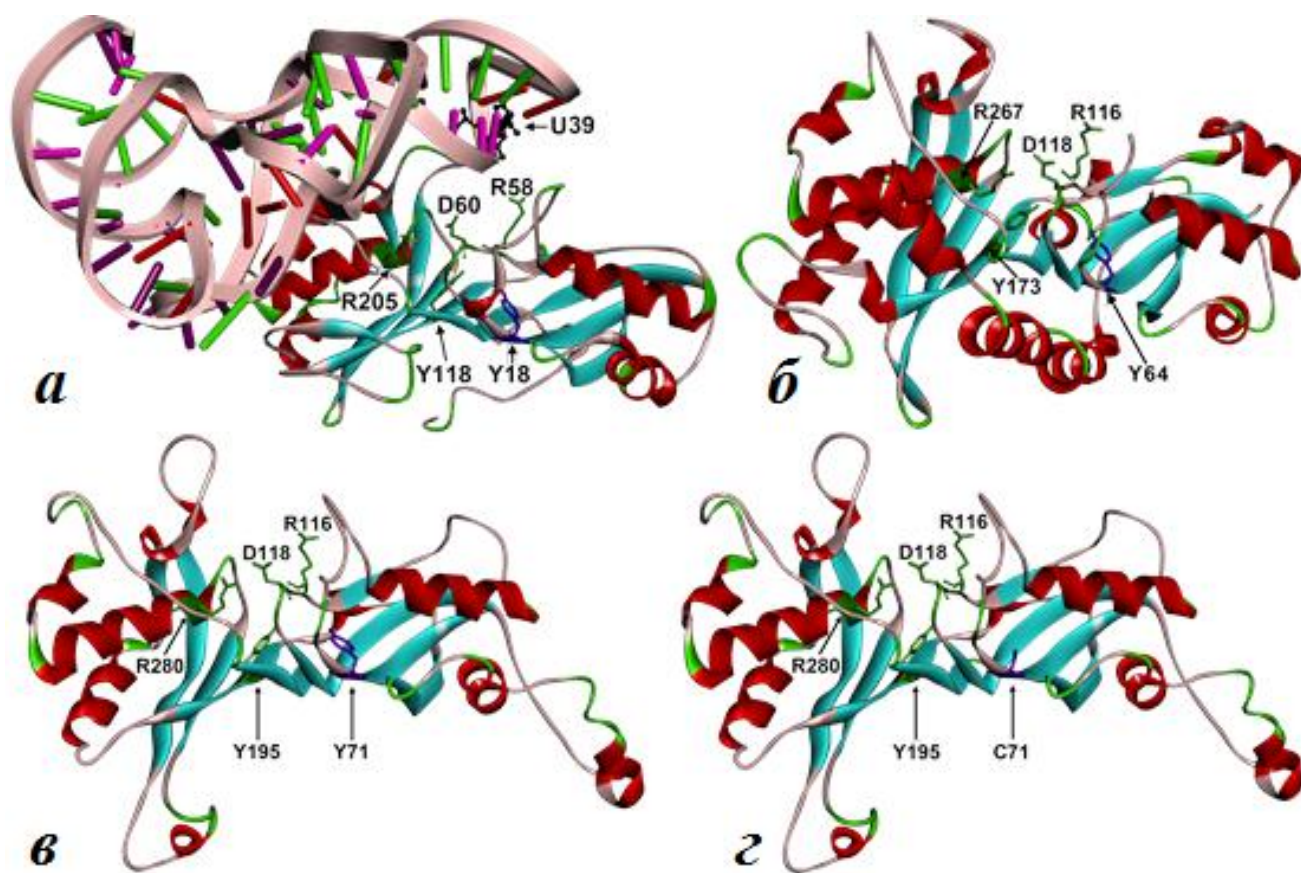


Рис. 3.9. Кристалічна структура бактеріальної TruA в комплексі з лейцил-тРНК (*a*, PDB ID: 2NQP) та каталітичного домену PUS1 людини (*б*, PDB ID: 4NZ6), моделі за гомологією каталітичного домену PUS3 людини дикого типу (*в*) та мутантного р.71Y>C (*г*). Кристалічна структура мономера псевдоуридинсинтази TruA в комплексі з лейцил-тРНК (*a*) – урацил в позиції 39 показано в чорному кольорі, амінокислотні залишки D146, R144, R295 і Y201 показані в зеленому кольорі, Y92 – в синьому кольорі. Кристалічна структура каталітичного домену PUS1 (*б*) – амінокислотні залишки D60, R58, R205 і Y118 показані в зеленому кольорі, Y18 – в синьому кольорі. Моделі за гомологією каталітичного домену PUS3 людини (*в*, *г*) – Y71 та C71 амінокислотні залишки показані в синьому кольорі, залишки D118, R116, R280 і Y195 наведені в зеленому кольорі [202, 205]

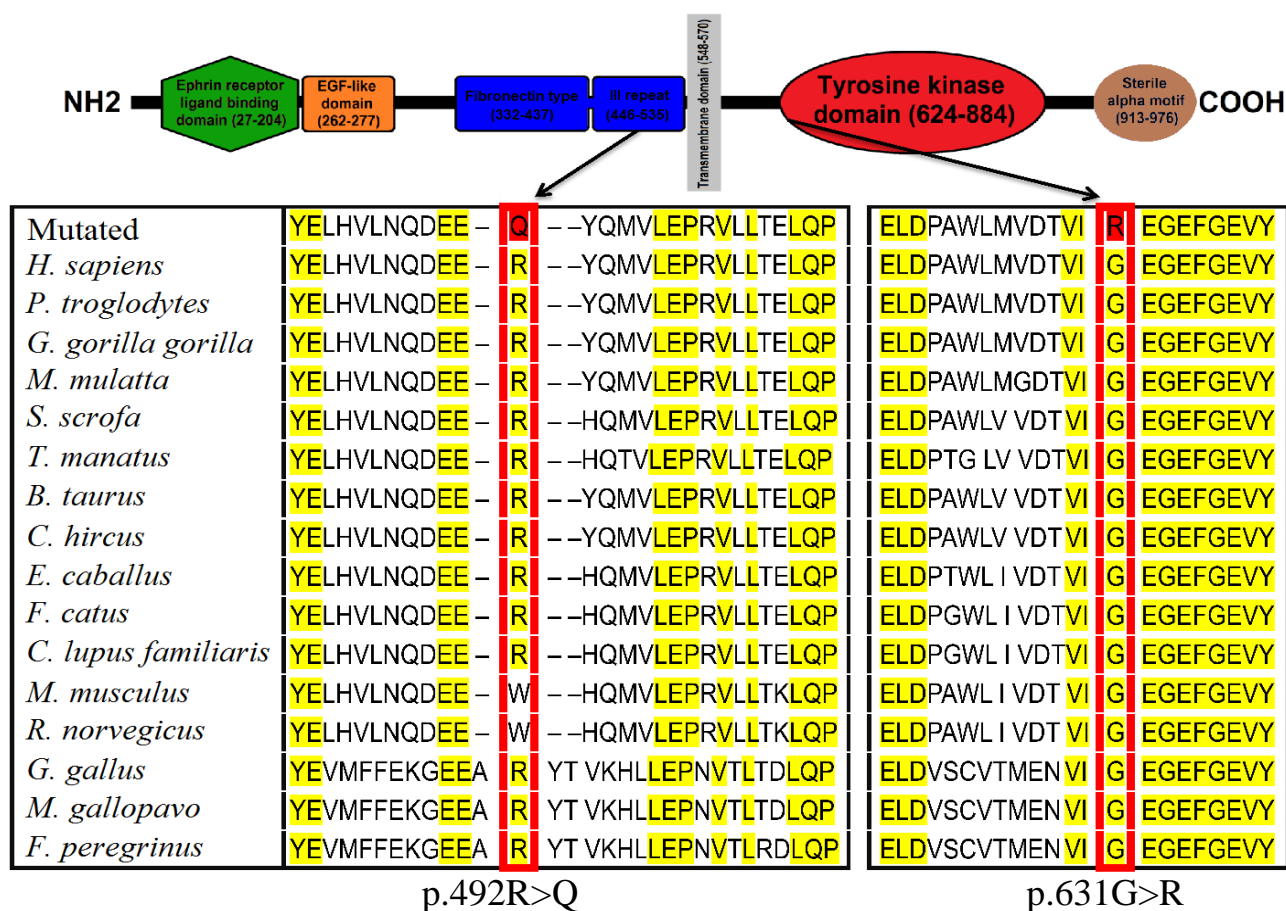


Рис. 3.10. Схематичне зображення структури білка EPHA1 людини та аналіз результатів множинного вирівнювання амінокислотних послідовностей білків-ортологів. Схема доменів білка EPHA1 людини, які включають: ліганд-зв'язуючий домен ефринового рецептора (27-204 позиції амінокислот) – зеленого кольору, EGF- подібний домен (262-277) – помаранчевого кольору, фібронектиновий повтор III-го типу (332-437, 446-535) – синього кольору, трансмембранний домен (548-570) – світло-фіолетового кольору, тирозинкіназний домен (624-884) – червоного кольору і стерильний альфа мотив (913-976) – коричневого кольору. Консервативні амінокислотні положення представлені в жовтому кольорі, амінокислотні положення Arg492 та Gly631 виділені червоним

Мононуклеотидна заміна с.1891G>A (раніше не описана) в 11 екзоні гена EPHA1 призводить до заміни гліцину в 631 положенні на аргінін (р.631G>R), що локалізована в тирозинкіназному домені білка EPHA1 (рис. 3.10). Аналіз відповідних сайтів білків-ортологів показав, що амінокислотна позиція Arg492 є



консервативною у тринадцяти з п'ятнадцяти представлених видів ссавців і птахів (крім миші та пацюка), а амінокислотна позиція Gly631 є консервативною у всіх п'ятнадцяти представлених видів, що вказує на можливу наявність еволюційно консервативної функції (рис. 3.10).

Заміна амінокислоти аргініну на глутамін в 492 положенні (р.492R>Q) локалізована в фібронектиновому повторі III типу ектодомену білка ЕРНА1, що виконує роль структурного спейсера, тобто забезпечує розташування інших доменів у просторі і відіграє важливу роль у формуванні інтерфейсів протеїн-протеїнової взаємодії з білками-партнерами та лігандом (рис. 3.11).

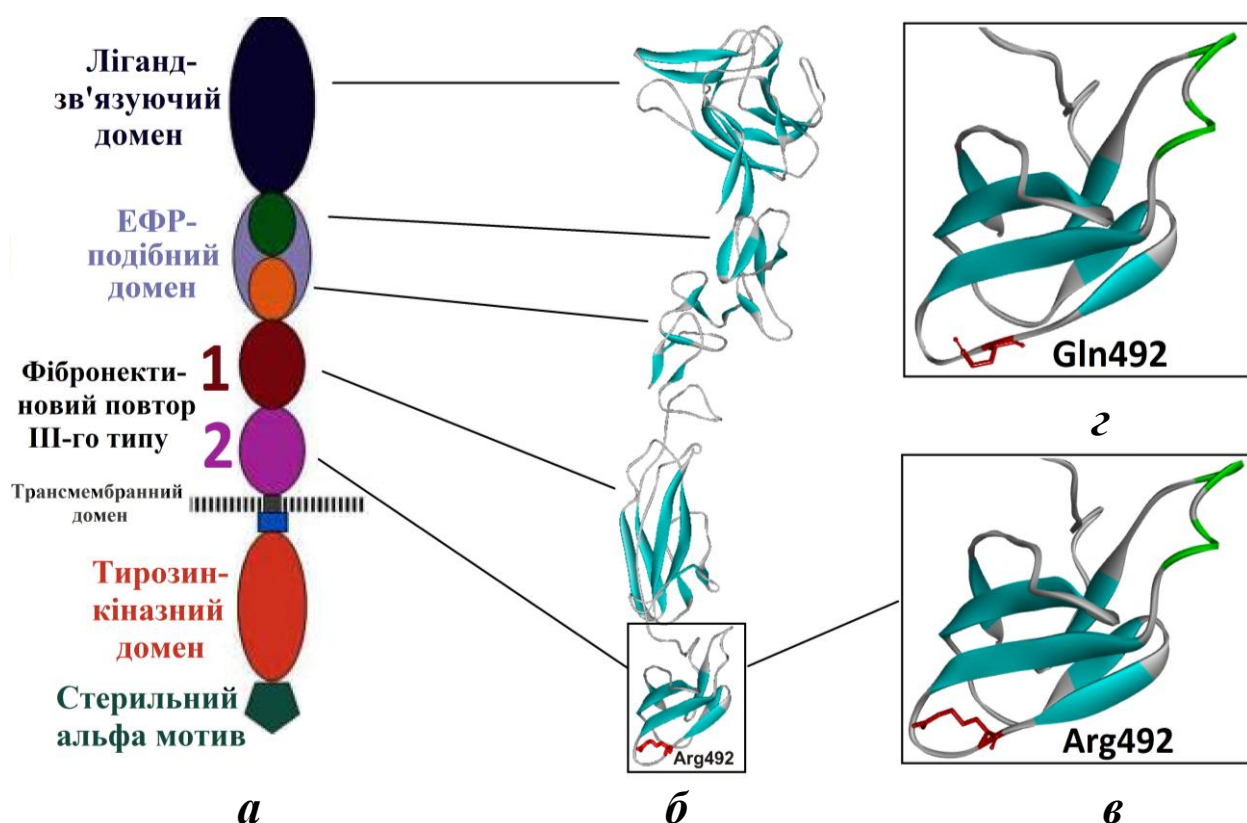


Рис. 3.11. Схематичне зображення структури ектодомену білка ЕРНА1 людини (а). Модель за гомологією ектодомену білка ЕРНА1 людини дикого типу (б, в) та мутантного р.492R>Q (з), що були отримані з використання ресурсу Swiss Model server. Зображення були створені за допомогою програми ViewerLite V.4.2., амінокислотні залишки Arg492 і Gln492 показані в червоному кольорі

Мутація р.492R>Q може безпосередньо призвести до змін у просторовій структурі, конформаційній гнучкості та рухливості ектодомену. Комп'ютерне моделювання за гомологією просторових структур нормального та мутантного ектодомену білка ЕРНА1 людини дало змогу з'ясувати, що аргінін 492 в послідовності білка ЕРНА1 людини відповідає аргініну в 486 положенні ЕРНА4 (рис. 3.12) [200, 210].

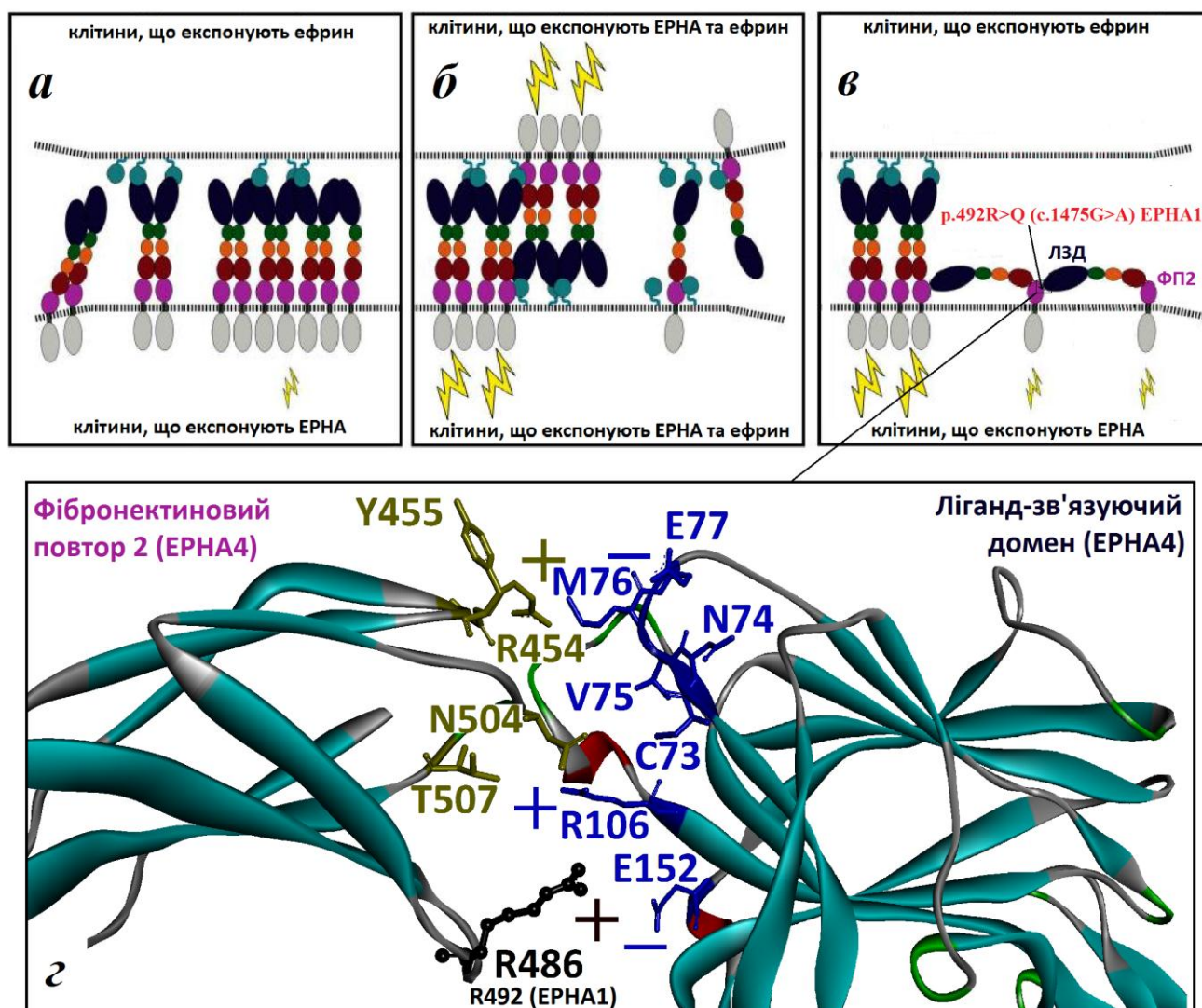


Рис. 3.12. Схематичне зображення різних способів кластеризації ефринних рецепторів в процесах ефрин/ЕРН-сигналіну (*а*, *б*, *в*) та інтерфейс взаємодії лігандзв'язуючого домену білка ЕРНА4 з фібронектиновим повтором ІІІ-го типу 2 іншого білка ЕРНА4 (*з*) [200, 210-212]. Залучені амінокислотні залишки виділені синім та зеленим кольором, R486 – чорним

Аргінін 486 в послідовності білка ЕРНА4 залучений у формування інтерфейсів протеїн-протеїнової взаємодії з білками-партнерами та лігандом при кластеризації ефринних рецепторів в процесах ефрин/ЕРН-сигналіngu [210]. Тому, заміна позитивно зарядженої амінокислоти аргініну в 492 положенні на глутамін в ЕРНА1 може знизити ефективність зв'язування з лігандами або білками-партнерами і ефрин/ЕРН-сигналіngu загалом.

Амінокислотна заміна гліцину в 631 положенні на аргінін (р.631G>R) локалізована в гліцин-багатому мотиві (P-loop) тирозинкіназного домену білка ЕРНА1, в АТФ-зв'язуючому сайті (рис. 3.13).

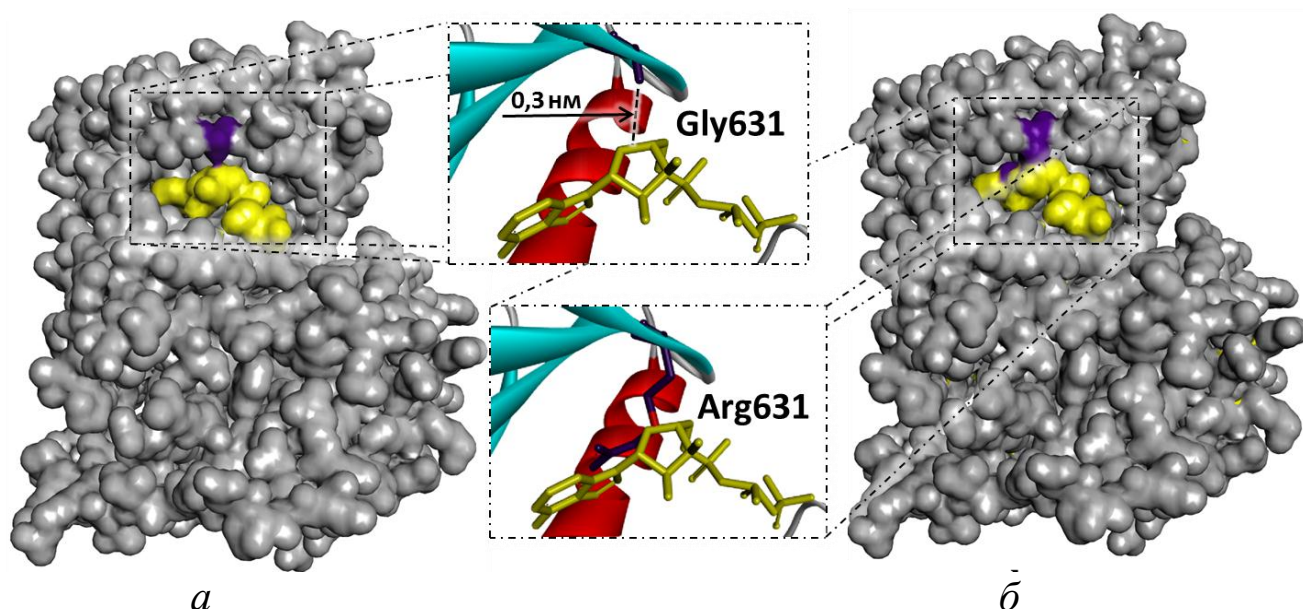


Рис. 3.13. Модель за гомологією тирозинкіназного домену білка ЕРНА1 людини дикого типу (а) та мутантного р.631G>R (б), що були отримані з використання ресурсу Swiss Model server. Зображення були створені за допомогою програми ViewerLite V.4.2., амінокислотні залишки Gly631 та Arg631 показані в фіолетовому кольорі, молекули АТФ представлені в жовтому колір

Гліцин в 631 положенні входить до числа амінокислотних залишків, що є критично важливими для формування АТФ-зв'язуючого сайту тирозинкіназ. І є

консервативною не лише еволюційно, а й серед представників як рецепторних так і нерепторних тирозинкіназ (рис. 3.14).

EPHA1	DPAWLMVDTVI	G	E	G	E	F	G	E	V	R	G	T	L	R	L	P	S
EPHA2	HPSCVTRQKVI	G	A	G	E	F	G	E	V	Y	K	G	M	L	K	T	S
EPHA3	DATNISIDKVV	G	A	G	E	F	G	E	V	C	S	G	R	L	K	L	P
EPHA4	DASCIKIEKVI	G	V	G	E	F	G	E	V	C	S	G	R	L	K	V	P
EPHA5	EASCITIERVI	G	A	G	E	F	G	E	V	C	S	G	R	L	K	L	P
EPHA6	DPSRIRIERVI	G	A	G	E	F	G	E	V	C	S	G	R	L	K	T	P
EPHA7	DASCIKIERVI	G	A	G	E	F	G	E	V	C	S	G	R	L	K	L	P
EPHA8	EASRIHIEKII	G	S	G	D	S	G	E	V	C	Y	G	R	L	R	V	P
EPHA10	DAKSVTLERSL	G	G	G	R	F	G	E	L	C	C	G	C	L	Q	L	P
EPHB1	DVSFVKIEEVI	G	A	G	E	F	G	E	V	Y	K	G	R	L	K	L	P
EPHB2	DISCVKIEQVI	G	A	G	E	F	G	E	V	C	S	G	H	L	K	L	P
EPHB3	DVSCVKIEEVI	G	A	G	E	F	G	E	V	C	R	G	R	L	K	Q	P
EPHB4	DVSYVKIEEVI	G	A	G	E	F	G	E	V	C	R	G	R	L	K	A	P
EPHB6	DPAYIKIEEVI	G	T	G	S	F	G	E	V	R	Q	G	R	L	Q	P	R
FGFR1	PRDRLVLGKPL	G	E	G	C	F	G	Q	V	V	L	A	E	A	I	G	L
RET	PRKNLVLGKTL	G	E	G	E	F	G	K	V	V	K	A	T	A	F	H	L
DDR1	PRSRLRFKEKL	G	E	G	Q	F	G	E	V	H	L	C	E	V	D	S	P
SRC	PRESLRLEVKL	G	Q	G	C	F	G	E	V	W	M	G	T	W	N	G	T
ABL1	ERTDITMKHKL	G	G	G	Q	Y	G	E	V	Y	E	G	V	W	K	K	Y
LYN	PRESIKLVKRL	G	A	G	Q	F	G	E	V	W	M	G	Y	Y	N	N	S
BTK	DPKDLTFLKEL	G	T	G	Q	F	G	V	V	K	Y	G	K	W	R	G	Q

Рис. 3.14. Аналіз результатів множинного вирівнювання амінокислотних послідовностей представників рецепторних та нерепторних тирозинкіназ людини. Консервативні амінокислотні положення представлені в жовтому кольорі, амінокислотне положення G631 (EPHA1) виділене червоним

Як можна бачити з рис. 3.13б бічна група аргініну в 631 положенні відстоїть в простір АТФ-зв'язуючого сайту EPHA1 і просторово ускладнює взаємодію з



АТФ. Таким чином, ми можемо припустити, що мутація p.631G>R може призвести до зниження ефективності зв'язування АТФ і протеїнкіназної активності загалом.

Узагальнюючи дані, наведені в цьому підрозділі, зазначимо – проведений нами біоінформатичний аналіз показує, що ідентифіковані в ході секвенування екзому двох хворих сибсів (хлопчиків) з несиндромальною ІН мутації в генах *EPHA1* (с.1475G>A – rs11768549 та с.1891G>A – раніше не описана), *PUS3* (с.212A>G – раніше не описана) та *ZNF527* (с.806\_808CAT>TGTGCA – rs386809049) призводять до амінокислотних замін у високо-консервативних мотивах функціонально важливих доменів білкових продуктів зазначених генів, які, в свою чергу, можуть призводити до змін в функціональній активності цих білків. Таким чином, гени *ZNF527*, *PUS3* та *EPHA1* є потенційними генами-кандидатами патогенезу у хворих з інтелектуальною недостатністю.

Тому наступний етап наших досліджень був присвячений порівняльному аналізу розповсюдження алельних варіантів генів *ZNF527*, *PUS3* та *EPHA1* за виявленими мутаціями у групі 65 пацієнтів з легкою ідіопатичною ІН, у яких не виявлено цитогенетичних і відомих молекулярно-генетичних чинників патогенезу ІН та контрольній групі, яка репрезентує населення з різних регіонів України (n=250).

#### **Основні результати пункту опубліковані в роботах:**

1. *EPHA1* gene SNPs analysis in population of Ukraine / Gulkovskyi R.V., Chernushyn S.Y., Kravchenko S.A., Bychkova G.M., Livshits L.A. // *Biopolymers & cell.* – 2013. – 29(5). – P. 506-510.
2. Association of the *EPHA1* gene polymorphism with idiopathic mild intellectual disability / Gulkovskyi R. V., Sivolob A.V., Livshits L. A. // *Biopolymers & cell.* – 2015. – 31(4). – P. 271-276.

3. *EPHA1* C1475T and C1891T polymorphisms in Ukrainian patients with idiopathic intellectual disability / R. V. Gulkovskiy, G.M. Bychkova, S.A. Kravchenko, N.V.Hryshchenko, S.Y. Chernushyn, M.Nõukas, M.Sauk, L. Milani, T. Pippucci, F. Balombo, C. Graziano, L. A. Livshits // *European Journal of Human Genetics*, Vol. 20 Suppl. 1, European human genetics conference 2013, June 8 – 11, 2013, Paris, France, P. 175
4. *EPHA1* as a new candidate gene for autosomal recessive non-syndromic intellectual disability / R. Gulkovskiy G. Volynets, S. Chernushyn, S. Kravchenko, L. A. Livshits // *European Journal of Human Genetics*, Vol. 22 Suppl. 1, European human genetics conference 2014, May 31 – June 3, 2014, Milan, Italy, P. 153.
5. *EPHA1* as a new candidate gene for non-syndromic intellectual disability / R. Gulkovskiy G. Volynets, S. Chernushyn, S. Kravchenko, L. A. Livshits // *ACTA Biochimica Polonica*, Vol. 61 Suppl. 1, Abstracts of the BIO 2014 Congress, September 9-12, 2014, Warsaw, Poland, P. 120.
6. *ZNF527* Gene rs386809049 Analysis in Population of Ukraine / Gulkovskiy RV, Chernushyn S.Y., Kravchenko S.A., Livshits L.A. // *Cytology and Genetics*. – 2015. – 49(4). – P. 240–244.
7. Novel gene *PUS3* c.A212G mutation in Ukrainian family with intellectual disability / Gulkovskiy R.V., Chernushyn S.Y., Livshits L.A. // *Biopolymers and Cell*. – 2015. – 31(2). – P. 123–130.

3.3. Порівняльний аналізу розповсюдження алельних варіантів гена *ZNF527* за заміною с.806\_808CAT>TGTGCA у групі пацієнтів з легкою інтелектуальною недостатністю та популяції України

Для аналізу алельних варіантів гена *ZNF527*, які являють собою делецію трьох нуклеотидів – CAT та інсерцію шести – TGTGCA (rs386809049), нами була розроблена методика (див. пункт 2.3.12.), яка базується на ПДРФ-аналізі

продуктів ампліфікації *in vitro* послідовностей ДНК, що містять обрану для дослідження індель.

Заміна с.806\_808CAT>TGTGCA, локалізована в кодуючій частині гена *ZNF527*, веде до зникнення сайту впізнання для ендонуклеази *NdeI*, що призводить до диференційного гідролізу різних алельних варіантів гена *ZNF527* ендонуклеазою рестрикції *NdeI* і дає можливість їх ідентифікувати.

На рис. 3.15 зображена електрофореграма розділення фрагментів, що утворились після гідролізу продукту ампліфікації гена *ZNF527* ендонуклеазою рестрикції *NdeI*, в 8% поліакриламідному гелі.

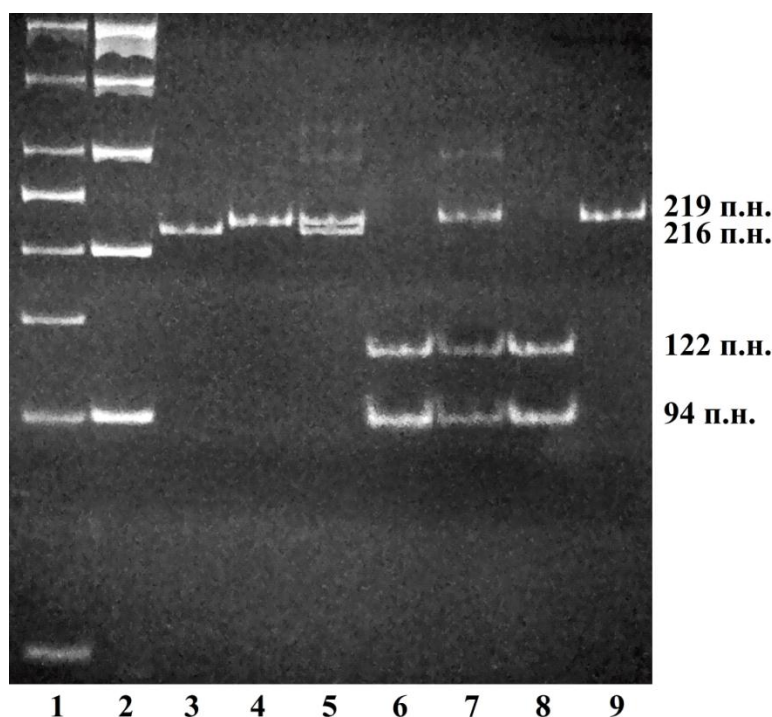


Рис. 3.15. Електрофореграма розділення фрагментів ПЛР-продукту гена *ZNF527*, що утворились після гідролізу специфічною ендонуклеазою рестрикції *NdeI*, в 8% ПААГ: 1 – маркер молекулярної маси (з кроком 50 п.н.); 2 – маркер молекулярної маси (з кроком 50 п.н.); 3, 4, 5 – інтактний ПЛР-продукт; 3, 6, 8 – індивіди з гомозиготним генотипом CAT/CAT; 5, 7 – індивіди з гетерозиготним генотипом CAT/TGTGCA; 4, 9 – індивіди з гомозиготним генотипом TGTGCA/TGTGCA

У індивідів без заміни с.806\_808 CAT/CAT ми спостерігаємо фрагменти довжиною 122 п.н., 94 п.н., у гетерозиготних носіїв заміни CAT/TGTGCA спостерігаються рестрикційні фрагменти довжиною 219 п.н, 122 п.н. та 94 п.н., а у гомозиготних носіїв заміни TGTGCA/TGTGCA – рестрикційні фрагменти довжиною 219 п.н. Контрольний зразок, гетерозиготний за поліморфним варіантом rs386809049, був верифікований за допомогою повного секвенування нуклеотидної послідовності продуктів ампліфікації гена *ZNF527* (рис. 3.3.).

Із використанням описаної методики аналізу алельного поліморфізму гена *ZNF527* нами проведено молекулярно-генетичне дослідження у групі пацієнтів з легкою інтелектуальною недостатністю та в контрольній вибірці населення з різних регіонів України. Результати наведено у табл. 3.1.

Таблиця 3.1

**Розподіл генотипів та алелів за заміною с.806\_808CAT>TGTGCA гена *ZNF527* у пацієнтів з легкою інтелектуальною недостатністю та в контрольній групі.**

	Контрольна група, n = 250	Група пацієнтів з ІН, n = 64
<b>Генотип, n (частота)</b>		
CAT/CAT	169 (0,676)	46(0,708)
CAT/TGTGCA	78 (0,312)	18(0,277)
TGTGCA/TGTGCA	3 (0,013)	1(0,015)
<b>Алель, n (частота)</b>		
CAT	416 (0,832)	110(0,846)
TGTGCA	84 (0,168)	20(0,154)

Отже, за результатами дослідження розповсюдження поліморфних варіантів гена *ZNF527* у вибірці, яка репрезентує населення з різних регіонів України,



нами вперше було отримано дані про розподіл частот генотипів та алельних варіантів за поліморфізмом rs386809049. Найбільш розповсюдженим генотипом, як видно з табл. 3.1, виявився гомозиготний за алелем дикого типу CAT/CAT (67,6%). Відповідно, мінорним, з частотою 0,168, є алель TGTGCA.

Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним в групі індивідів з легкою ІН та в контрольній групі свідчить про випадковий розподіл генотипів у відповідності зі співвідношенням Харді-Вайнберга в цих групах. Показники гетерозиготності наведені у таблиці 3.2. Як видно з таблиці, достовірної різниці між фактичною та теоретичною гетерозиготністю в групі індивідів з легкою ІН та в контрольній групі виявлено не було.

Таблиця 3.2

#### Фактична та теоретична гетерозиготність за rs386809049 гена *ZNF527*

	Гетерозиготність		$\chi^2$	p
	( $H_o$ )	( $H_e$ )		
Контрольна група	0,312	0,28	3,37	0,07
Група індивідів з легкою ІН	0,277	0,26	0,26	0,61

Примітки:  $H_o$  – фактична гетерозиготність;  $H_e$  – теоретична гетерозиготність

При порівнянні розподілу генотипів та алелів за заміною с.806\_808CAT>TGTGCA гена *ZNF527* в дослідній групі пацієнтів з легкою ІН та контрольній групі достовірної різниці ( $p>0,05$ ) виявлено не було (табл. 3.1). В групі пацієнтів з легкою ІН було виявлено одного гомозиготного носія мінорного алеля TGTGCA гена *ZNF527*. Проте і в контрольній групі були виявлені три здорових індивіда з подібним генотипом. Оскільки саме цей генотип раніше ідентифіковано у сибсів з несиндромальною ІН, а частота мінорного алеля сягала

16,8% в контрольній групі, заміну с.806\_808CAT>TGTGCA в гені *ZNF527* було виключено зі списку потенційних кандидатів, залучених в патогенез ІН.

### **Основні результати пункту опубліковані в роботі:**

*ZNF527* Gene rs386809049 Analysis in Population of Ukraine / Gulkovskiy RV, Chernushyn S.Y., Kravchenko S.A., Livshits L.A. // *Cytology and Genetics*. – 2015. – 49(4). – P. 240–244.

3.4. Порівняльний аналіз розповсюдження алельних варіантів гена *PUS3* за заміною с.212A>G у групі пацієнтів з легкою інтелектуальною недостатністю та популяції України

Мутація с. 212 A>G локалізована у 1-му екзоні гена *PUS3* і являє собою мононуклеотидну заміну аденіну на гуанін (транзицію). Для визначення частоти мутації с.212A>G гена *PUS3* нами була розроблена методика (див. пункт 2.3.11.) ампліфікації *in vitro* послідовностей ДНК, що містять обрану для дослідження МНЗ, з використанням сайт-специфічної ПЛР.

Для проведення сайт-специфічної ПЛР використовували по парі специфічних олігонуклеотидних праймерів для кожного з алельних варіантів – 212A та 212G. Послідовності праймерів та температурно-часові умови проведення ПЛР наведені у пункті 2.3.11.

Для кожного індивіда проводили ПЛР реакцію, використовуючи одну ПЛР суміш з обома парами специфічних олігонуклеотидних праймерів для кожного з алельних варіантів. ПЛР продукти аналізували в 2-ному агарозному гелі. Розмір ампліфікованих фрагментів становить: 193 п.н. – ампліфікується при відпалюванні праймерів, комплементарних послідовності алельного варіанта 212A, 172 п.н. – ампліфікується при відпалюванні праймерів, комплементарних

послідовності алельного варіанта 212G та 320 п.н. – ампліфікується у всіх реакціях (рис. 3.16). Для контролю аналізу використовували зразок ДНК індивіда із досліджуваною заміною у гетерозиготному стані. Генотип даного індивіда встановлений за допомогою повного секвенування нуклеотидної послідовності продукту ампліфікації 1 екзона гена *PUS3* (рис. 3.2.).

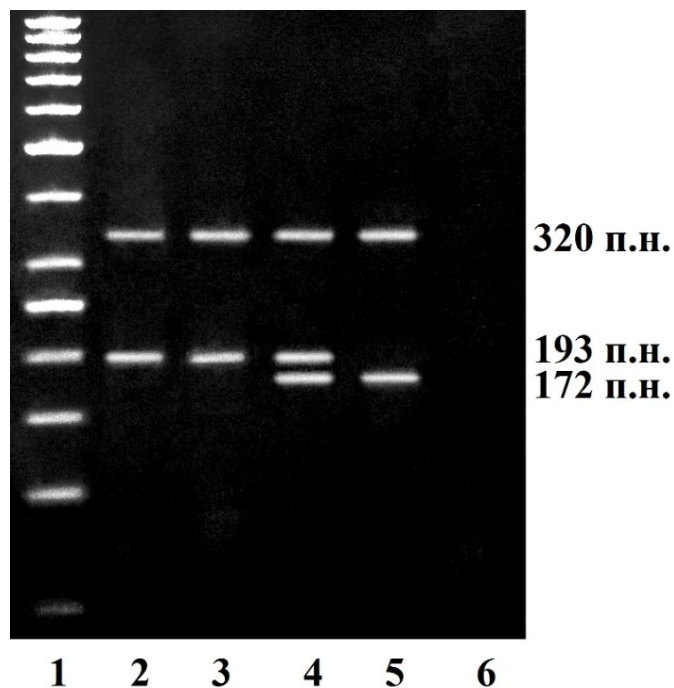


Рис. 3.16. Електрофореграма розділення фрагментів ПЛР-продукту гена *PUS3*, в 2% агарозному гелі: 1 – маркер молекулярної маси (з кроком 50 п.н.); 2, 3 – індивіди з гомозиготним генотипом AA, 4, – індивід з гетерозиготним генотипом AG, 5 –індивід з гомозиготним генотипом GG, 6 – негативний контроль (H<sub>2</sub>O)

Отже, за результатами дослідження розповсюдження алельних варіантів гена *PUS3* у вибірці, яка репрезентує населення з різних регіонів України, нами вперше було отримано дані про розподіл частот генотипів та алелів за новою мононуклеотидною мутацією с.212A>G (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

**Розподіл генотипів та алелів за мононуклеотидною заміною с.212А >G  
гена *PUS3* у індивідів з популяції України**

Генотип / алель	Кількість (частота)
Загалом	250
AA	249 (0,996)
AG	1 (0,004)
GG	0
Алель 212А	499 (0,9973)
Алель 212G	1 (0,002)

Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним в популяційній групі свідчить про випадковий розподіл генотипів у відповідності зі співвідношенням Харді-Вайнберга. Показники гетерозиготності досліджуваних локусів наведені у таблиці 3.4. Як видно з таблиці, достовірної різниці між фактичною та теоретичною гетерозиготністю виявлено не було, що свідчить про нормальний розподіл алелів цього локуса у популяційній вибірці населення з різних регіонів України.

Таблиця 3.4

**Фактична та теоретична гетерозиготність за с.212А>G гена *PUS3***

Локус	Гетерозиготність		$\chi^2$	p
	( $H_o$ )	( $H_e$ )		
rs386809049 ген <i>PUS3</i>	0,004	0,004	0,001	0,97

Примітки:  $H_o$  – фактична гетерозиготність;  $H_e$  – теоретична гетерозиготність

Серед 250, проаналізованих в даному дослідженні зразків, ми виявили лише одного гетерозиготного носія мутації с.212A>G, а частота мінорного алеля 212G склала 0,002. Ми не виявили заміну с.212A>G у жодного з 65 індивідів в групі пацієнтів з легкою інтелектуальною недостатністю. Таким чином, асоціації заміни с.212A>G в гені *PUS3* з патогенезом інтелектуальної недостатності доведено не було.

Ген *PUS3* людини кодує псевдоуридинсинтазу 3. Псевдоуридинсинтаза 3 каталізує перетворення уридину на псевдоуридин (Ψ) в 39 положенні більшості ядерних тРНК [213, 214]. Псевдоуридин у положеннях 38-40 в молекулах тРНК відіграє важливу роль у забезпеченні ефективності і точності трансляції [215, 216]. Тобто ген *PUS3* є геном «домашнього господарства». Фізіологічне значення дизфункції псевдоуридинсинтаз можна оцінити на прикладі таких розладів, як вроджений дискератоз та синдром Hoyeraal-Hreidarsson – спричинені мутаціями в гені *DKC1*, а також MLASA (mitochondrial myopathy and sideroblastic anemia – мітохондріальна міопатія та сидеробластна анемія), що спричинена мутаціями в гені *PUS1* [217-220].

Подібний плейотропний ефект мав спостерігатися і у випадку ідентифікованої в ході даного дослідження гомозиготної мутації с.212A>G в гені *PUS3*, якщо б ця мутація впливала на каталітичну активність ферменту. Проте, фенотип обох обстежених нами суб'єктів з ІН має несиндромальний характер. Крім того, ні в анамнезі пацієнтів, ні в ході детального біохімічного аналізу крові нами не було виявлено будь-яких доказів гіпопротеїнемії, яка є загальним симптомом для MLASA та DKC і могла б бути свідченням порушення синтезу білка. Тому ми схилиємося до думки, що мутація с.212A>G в гені *PUS3* є нейтральною і не може бути основною причиною ІН. Водночас, враховуючи низьку частоту алеля 212G (0,002) в популяції України і той факт, що амінокислотна заміна р.71Y>C знаходиться в безпосередній близькості від активного центру білка *PUS3* (підрозділ 3.2.), ми не виключаємо, що мутація с.212A>G в гені *PUS3* може бути

модифікатором фенотипу при деяких патологіях, включаючи синдромальну інтелектуальну недостатність.

### **Основні результати пункту опубліковані в роботі:**

Novel gene *PUS3* c.A212G mutation in Ukrainian family with intellectual disability / Gulkovskiy R.V., Chernushyn S.Y., Livshits L.A. // *Biopolymers and Cell.* – 2015. – 31(2). – P. 123–130.

3.5. Порівняльний аналіз розповсюдження алельних варіантів гена *EPHA1* за замінами c.1475G>A та c.1891G>A у групі пацієнтів з легкою інтелектуальною недостатністю та популяції України

Для аналізу алельних варіантів гена *EPHA1* за мононуклеотидними замінами c.1475G>A та c.1891G>A нами були розроблені та оптимізовані методики (див. пункт 2.3.11. та 2.3.12.), які базуються на ПДРФ-аналізі продуктів ампліфікації *in vitro* послідовностей ДНК, що містять обрані для дослідження МНЗ – для c.1475G>A (rs11768549) та на сайт-специфічній ПЛР – для вперше ідентифікованої мутації c.1891G>A.

Поліморфізм rs11768549 (c.1475 G>A) являє собою однонуклеотидну заміну G на A (транзицію) в 7 екзоні гена *EPHA1*. Заміна c.1475 G>A веде до зникнення сайту впізнавання для специфічної ендонуклеази *KpnI*, що призводить до диференційного гідролізу різних алельних варіантів гена *EPHA1* і дає можливість їх ідентифікувати.

ПЛР-продукт, що утворюється при використанні зазначених у пункті 2.3.12. праймерів, має розмір 194 п.н. Таким чином, після гідролізу специфічною ендонуклеазою рестрикції, продукт ампліфікації алеля 1475G гена *EPHA1* буде розчеплений на два фрагменти, довжиною 101 п.н. та 93 п.н. Продукт

ампліфікації алеля 1475A не буде гідролізуватися. Наявність продуктів ампліфікації та розділення фрагментів ПЛР продукту гена *EPHA1*, після гідролізу специфічною ендонуклеазою рестрикції *KpnI* аналізували за допомогою електрофорезу в 2%-му агарозному гелі (рис. 3.17).

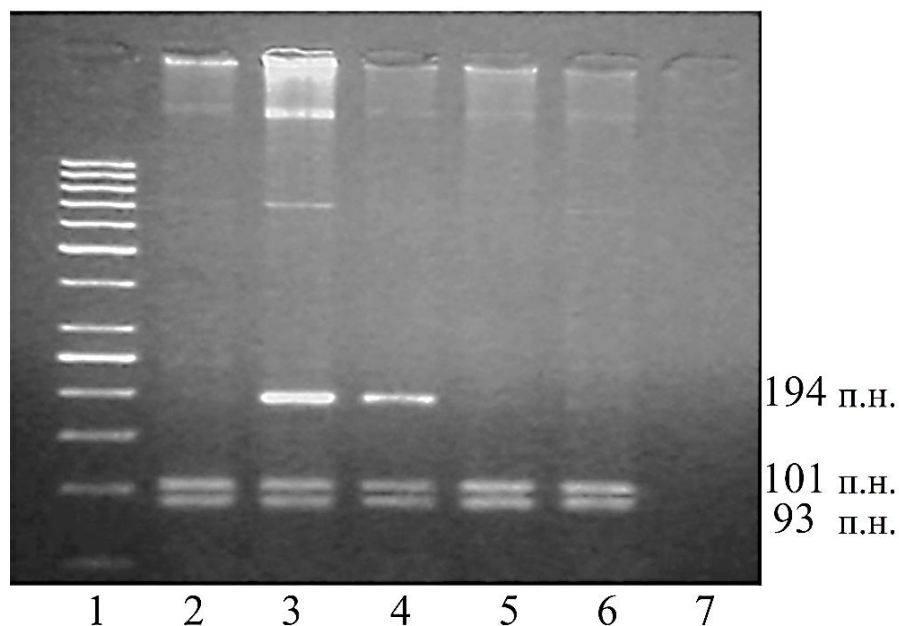


Рис. 3.17. Електрофореграма розділення фрагментів ПЛР-продукта гена *EPHA1*, що утворились після його гідролізу специфічною ендонуклеазою рестрикції *KpnI*: 1 – маркери молекулярної маси (з кроком 50 п.н.); 2, 5, 6 – індивіди, що мають генотип GG; 3, 4 – індивіди з генотипом GA; 7 – негативний контроль (H<sub>2</sub>O)

Для контролю аналізу використовували зразок ДНК індивіда із досліджуваною заміною с.1475 G>A у гетерозиготному стані. Генотип даного індивіда встановлений за допомогою повного секвенування нуклеотидної послідовності продукту ампліфікації 7 екзона гена *EPHA1* (рис. 3.1).

Для проведення молекулярно-генетичного аналізу мутації с.1891G>A гена *EPHA1* нами було розроблено методику з використанням сайт-специфічної ПЛР.

Для проведення сайт-специфічної ПЛР використовували 3 олігонуклеотидних праймери, один спільний та два специфічних для кожного з алельних варіантів – 1891G та 1891A. З метою підвищення специфічності роботи праймерів та уникнення формування димерів в олігонуклеотидні послідовності були внесені некомплементарні основи. Послідовності праймерів та температурно-часові умови проведення ПЛР наведені у пункті 2.3.11.

Для кожного індивіда проводили дві ПЛР реакції, використовуючи дві ПЛР суміші з спільним праймером та з одним із специфічних праймерів для кожного з алельних варіантів. ПЛР продукти аналізували в 2%-му агарозному гелі (рис. 3.18). Розмір ампліфікованих фрагментів становить 204 п.н.

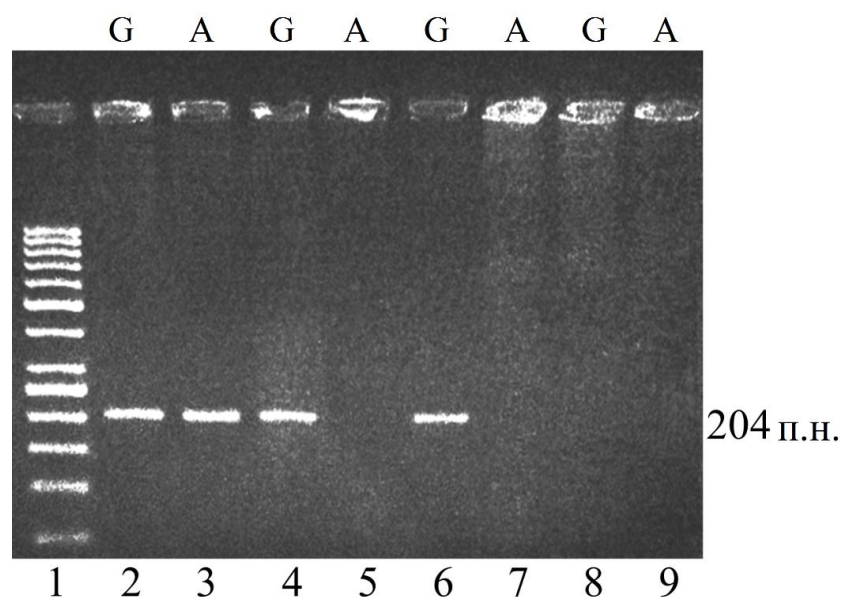


Рис. 3.18. Електрофореграма розділення фрагментів ПЛР-продукту гена *ERNA1*, що утворились після сайт-специфічної ПЛР: 1 – маркери молекулярної маси (з кроком 50 п.н.); 2, 3 – індивід, що має генотип GA; 4, 5, 6, 7 – індивіди з генотипом GG; 8, 9 – негативний контроль (H<sub>2</sub>O)

Ми не виявили заміну с.1891G>A у жодного з 315 індивідів, включених в дане дослідження, як в популяційній вибірці неспоріднених донорів з різних



регіонів України (n=250), так і в групі пацієнтів з легкою інтелектуальною недостатністю (n=65). Дану заміну в гетерозиготному стані було знайдено тільки у членів вищезгаданої родини – у двох рідних братів з ІН та їх батька. Крім того, мононуклеотидну заміну с.1891G>A не було ідентифіковано в жодній з популяцій, досліджених в ході таких проектів, як Exome Aggregation Consortium (URL: <http://exac.broadinstitute.org>), International HarMap Project (URL: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) та 1000 Genomes Project (URL: <http://browser.1000genomes.org/>) тощо. Таким чином, ми припускаємо, що транзиція с.1891G>A в гені *EPHA1* є патогенною мутацією з у край низькою частотою. Результати аналізу розподілу генотипів за заміною с.1475G>A у в гені *EPHA1* в популяції України та у групі пацієнтів з легкою інтелектуальною недостатністю наведено у табл. 3.5.

Таблиця 3.5

**Розподіл генотипів та алелів за мононуклеотидною заміною с.1475G>A, гена *EPHA1* у пацієнтів з легкою ІН та в контрольній групі**

	Контрольна група, n = 250	Група пацієнтів з ІН, n = 65
Генотип, n (%)		
GG	245 (98)	60 (92,3)
GA	5 (2)	5 (7,7)
AA	0	0
Алель, n (частота)		
G	495 (0,99)	125 (0,962)
A	5 (0,01)	5 (0,038)*

Примітки: n – кількість індивідів; \* – різниця між значенням показника в досліджуваних групах є статистично достовірною (p<0,05)

Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним в свідчить про випадковий розподіл генотипів у відповідності зі співвідношенням Харді-Вайнберга. Показники гетерозиготності досліджуваних локусів наведені у таблиці 3.6. Як видно з таблиці, достовірної різниці між фактичною та теоретичною гетерозиготністю в популяції України та у групі пацієнтів з легкою інтелектуальною недостатністю виявлено не було.

Таблиця 3.6

**Фактична та теоретична гетерозиготність за с.1475 G>A гена *EPHA1***

	Гетерозиготність		$\chi^2$	p
	(H <sub>o</sub> )	(H <sub>e</sub> )		
Контрольна група	0,02	0,02	0,03	0,87
Група індивідів з легкою ІН	0,077	0,074	0,10	0,75

Примітки: H<sub>o</sub> – фактична гетерозиготність; H<sub>e</sub> – теоретична гетерозиготність

Серед 250, проаналізованих в даному дослідженні зразків з контрольної групи, ми виявили лише 5 гетерозиготних носіїв заміни с.1475G>A, а частота мінорного алеля 1475A склала 0,01. Відповідно, мажорним алельним варіантом є 1475G. В досліджуваній групі пацієнтів з легкою інтелектуальною недостатністю нами теж було виявлено 5 (0,077) гетерозиготних носіїв поліморфного алеля 1475A. Мажорним в досліджуваній групі, як і у популяційній вибірці, виявився гомозиготний генотип 1475 GG (0,923). Ми встановили, що частота мінорного алеля 1475A гена *EPHA1* в групі пацієнтів з ІН (0,038) була достовірно (p<0,05) вищою порівняно з контрольною популяційною групою (0,01). Більше того, за розрахунками показника відношення шансів встановлено, що індивіди-носії мінорного алеля 1475A гена *EPHA1* мають в 4 рази вищий відносний ризик

розвитку ІН (OR= 4,05; ДІ 95%: 1,15 – 14,56; p=0,02). Таким чином, нами отримано дані на користь того, що МНЗ с.1475G>A (rs11768549) гена *EPHA1* може бути залученою до патогенезу ІН у хворих з родини №094 і її можна розглядати як імовірний фактор спадкової схильності до розвитку інтелектуальної недостатності.

На користь цього також можуть свідчити дані отримані в ході кількох GWAS (genome-wide association study) досліджень, в яких було виявлено асоціацію ідентифікованої нами заміни с.1475G>A (rs11768549), а також мутації rs202178565 та поліморфізмів rs11767557 і rs11771145 гена *EPHA1* з хворобою Альцгеймера – нейродегенеративним захворюванням, що супроводжується стійким порушенням когнітивних функцій (деменцією) в результаті органічного ураження мозку [221-225]. *EPHA1* є членом найбільшої підродини рецепторних тирозинкіназ (РТК) і відіграє ключову роль в процесах розвитку, у тому числі нервової системи, де бере участь у ephrin/EPH сигналінгу, який забезпечує зв'язок між сусідніми популяціями клітин, регуляцію процесів міграції нейронів та аксонального наведення [226-232]. Крім того *EPHA1* є частиною однієї з небагатьох відомих на сьогодні генних мереж асоційованих з ІН – Rho-ГТФазного сигнального шляху і на високому рівні експресується в головному мозку дорослих і в тканинах нервової трубки під час нейрогенезу [232-235].

Ми вважаємо, що отримані дані про розподіл генотипів за МНЗ с.1475G>A та с.1891G>A в гені *EPHA1*, а також локалізація відповідних амінокислотних замін р.492R>Q та р.631G>R в консервативних мотивах функціонально важливих доменів залученого до розвитку та функціонування ЦНС рецептора *EPHA1*, є вагомими аргументами на користь того, що вперше ідентифікована нами мутація с.1891G>A в компаунді з мононуклеотидною заміною с.1475G>A (rs11768549) гена *EPHA1* є детермінуючим генетичним чинником інтелектуальної недостатності у пацієнтів з обстеженої родини №094.

Ми пропонуємо ген *EPHA1* як потенційний, асоційований з Rho-ГТФазним сигнальним шляхом, ген-детермінатор інтелектуальної недостатності, білковий продукт якого залучений до розвитку та функціонування ЦНС.

**Основні результати пункту опубліковані в роботах:**

1. *EPHA1* gene SNPs analysis in population of Ukraine / Gulkovskyi R.V., Chernushyn S.Y., Kravchenko S.A., Bychkova G.M., Livshits L.A. // *Biopolymers & cell.* – 2013. – 29(5). – P. 506-510.
2. Association of the *EPHA1* gene polymorphism with idiopathic mild intellectual disability / Gulkovskyi R. V., Sivolob A.V., Livshits L. A. // *Biopolymers & cell.* – 2015. – 31(4). – P. 271-276.
3. *EPHA1* C1475T and C1891T polymorphisms in Ukrainian patients with idiopathic intellectual disability / R. V. Gulkovskyi, G.M. Bychkova, S.A. Kravchenko, N.V.Hryshchenko, S.Y. Chernushyn, M.Nõukas, M.Sauk, L. Milani, T. Pippucci, F. Balombo, C. Graziano, L. A. Livshits // *European Journal of Human Genetics*, Vol. 20 Suppl. 1, European human genetics conference 2013, June 8 – 11, 2013, Paris, France, P. 175
4. *EPHA1* as a new candidate gene for autosomal recessive non-syndromic intellectual disability / R. Gulkovskyi G. Volynets, S. Chernushyn, S. Kravchenko, L. A. Livshits // *European Journal of Human Genetics*, Vol. 22 Suppl. 1, European human genetics conference 2014, May 31 – June 3, 2014, Milan, Italy, P. 153.
5. *EPHA1* as a new candidate gene for non-syndromic intellectual disability / R. Gulkovskyi G. Volynets, S. Chernushyn, S. Kravchenko, L. A. Livshits // *ACTA Biochimica Polonica*, Vol. 61 Suppl. 1, Abstracts of the BIO 2014 Congress, September 9-12, 2014, Warsaw, Poland, P. 120.

### 3.6. Вибір функціонально значущих поліморфних варіантів генів *LIF* та *EPHA1*

Окрім пошуку та досліджень генів-детермінаторів, мутації в яких спричинюють патогенез моногенних форм інтелектуальної недостатності, важливим та актуальним також є дослідження факторів спадкової схильності розвитку мультифакторних форм ІН та генів-модифікаторів, які відповідальні за варіювання пенетрантності та експресивності патологічних ознак у пацієнтів з однаковим генотипом за геном-детермінатором.

На сьогодні, для пошуку генів, ймовірно залучених до розвитку МФЗ, існують два основні підходи. Перший з них (так звані GWAS) полягає в рандомізованому дослідженні варіювання на рівні усього геному з наступним аналізом асоціації поліморфних варіантів з патологією [236]. Альтернативним є підхід вивчення генів-кандидатів. Він полягає в підборі вже відомих за своєю функцією генів та дослідженні асоціації їх поліморфізмів з певною патологією у порівнянні з контролем. Дослідження поліморфних варіантів відомих генів-детермінаторів ІН та генів-кандидатів, що входять до складу асоційованих з інтелектуальною недостатністю генних мереж (наприклад Rho ГТФазний та ERK/MAP-кіназний сигнальні шляхи) є перспективним напрямком пошуку генетичних маркерів схильності, асоційованих з патогенезом мультифакторних форм інтелектуальної недостатності.

Виділений нами в ході даного дослідження як ген-детермінатор *EPHA1* був обраний для аналізу в якості гена схильності до мультифакторних форм інтелектуальної недостатності. За результатами проведеного нами біоінформатичного аналізу послідовності регуляторних ділянок гена *EPHA1*, на додачу до ідентифікованої в ході секвенування екзому двох хворих сибсів з несиндромальною ІН МНЗ с.1475G>A, нами були обрані для дослідження МНЗ rs11767557 (синонім п.75-3022T>C) та rs11771145 (синонім п.75-1399G>A)

локалізовані у регуляторній некодуючій послідовності *EPHA1-AS1* (*EPHA1 antisense RNA 1*) поряд з промотором гена [221-223]. Аналіз літературних даних показав наявність кількох GWAS-досліджень, в яких було виявлено асоціацію поліморфізмів rs11767557 (далі n.3022T>C) та rs11771145 (далі n.1399G>A) гена *EPHA1* з нейродегенеративним захворюванням хворобою Альцгеймера [221-223].

В якості ще одного генетичного чинника схильності до мультифакторних форм інтелектуальної недостатності може розглядатися ген *LIF*, що кодує нейроцитокін лейкоїя-інгібуючий фактор (LIF), який є ключовим регулятором процесів ембріогенезу та нейрогенезу у ссавців, як і ген *EPHA1* [237-241]. Окрім того, ген *LIF*, як і *EPHA1*, входять до складу однієї з небагатьох відомих на сьогодні асоційованих з інтелектуальною недостатністю генних мереж – ERK/MAP-кіназного сигнального шляху (підпункт 1.2.3.3.) [240, 241].

З метою вибору функціонально значущих поліморфних варіантів гена *LIF* для дослідження в якості генетичних маркерів спадкової схильності до ІН використовували наступні критерії. По-перше, поліморфізм мав корелювати з рівнем продукції відповідного білка або потенційно впливати на нього. Таку інформацію про значущість поліморфного варіанта отримували за допомогою інструментів передбачення ролі мононуклеотидної заміни онлайн-ресурсу SNPinfo. Окрім того, для мононуклеотидних замінь, розташованих в промоторних ділянках чи в першому інтроні, перевіряли можливий вплив на структуру сайтів упізнавання транскрипційних факторів з використанням програми PROMO. Окрім того, за наявності, брали до уваги результати експериментів *in vitro* та *in vivo*. По-друге, частота мінорного алеля в досліджених європейських популяцій повинна була бути не менше 0,2.

Аналіз послідовності регуляторних ділянок гена *LIF* дозволив нам обрати для дослідження поліморфний варіант rs929271 (синонім с.4524 T>G), який розташований в 3'-нетрансльованій області (3'-НТО, англ. 3'-untranslated region,

3'-UTR) гена [242]. Показано, що поліморфізм rs929271 може спричинювати зменшення стабільності мРНК і, тим самим, може впливати на рівень секреції LIF [242]. Крім того, в попередніх дослідженнях було показано асоціацію поліморфізму rs929271 (далі с.4524Т>G) з шизофренією та погіршенням функції робочої пам'яті [243, 244].

Отже, на наступних етапах наших досліджень, з метою пошуку факторів спадкової схильності розвитку інтелектуальної недостатності, ми провели порівняльний аналіз розподілу генотипів та алельних варіантів за поліморфними локусами п.3022Т>С (rs11767557) і п.1399G>А (rs11771145) гена *EPHA1* та с.4524 Т>G гена *LIF* в групі пацієнтів з легкою ІН та контрольній групі.

3.7. Дослідження поліморфізму с.4524Т>G гена *LIF* як фактора спадкової схильності розвитку легкої інтелектуальної недостатності

Молекулярно-генетичний аналіз поліморфізму rs929271 (синонім с.4524 Т>G) гена *LIF* проводився на основі розробленого та оптимізованого нами методу ПЛР (описаного в розділі 2.2.6.) з наступним рестрикційним аналізом методом ПДРФ. Поліморфізм rs929271 являє собою трансверсію – мононуклеотидну заміну тиміну на гуанін в 3'-нетрансльованій області (3'-НТО, англ. 3'-untranslated region, 3'-UTR) гена *LIF*. Заміна с.4524 Т>G веде до зникнення сайту впізнання для ендонуклеази, що призводить до диференційного гідролізу різних алельних варіантів гена *LIF* ендонуклеазою рестрикції *HinfI* і дає можливість їх ідентифікувати. Наявність продуктів ампліфікації та розділення фрагментів ПЛР продукту гена *LIF*, після гідролізу специфічною ендонуклеазою рестрикції *HinfI* аналізували за допомогою електрофорезу в 2%-му агарозному гелі (рис. 3.19).

ПЛР-продукт, що утворюється при використанні зазначених в підрозділі 2.3.6. праймерів має розмір 298 п.н. В результаті гідролізу ампліфіковані фрагменти

ДНК алельного варіанта 4524Т розщеплюються на два фрагменти, розмір одного з яких становить 159 п.н., а розмір іншого – 139 п.н. Продукт ампліфікації алеля 4524G залишається інтактним. Відповідно, в зразках індивідів, які є гетерозиготними носіями МНЗ с.4524Т>G, спостерігали три фрагменти довжиною 298 п.н., 159 п.н. та 139 п.н.

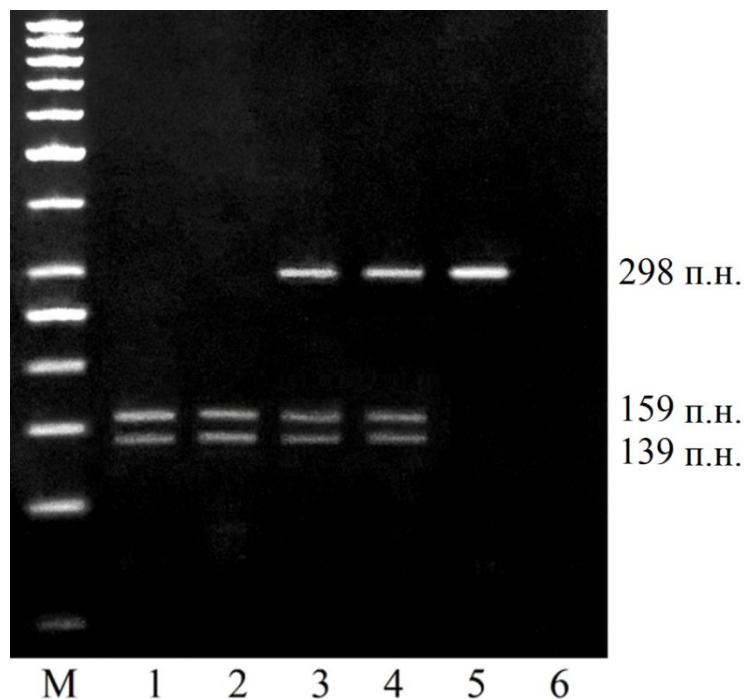


Рис. 3.19. Електрофореграма розділення фрагментів ПЛР-продукту гена *LIF*, що утворились після гідролізу специфічною ендонуклеазою рестрикції *HinfI*, в 2% агарозному гелі: М – маркер молекулярної маси (з кроком 50 п.н.); 1, 2 – індивіди з гомозиготним генотипом ТТ, 3, 4, – індивіди з гетерозиготним генотипом ТG, 5 –індивід з гомозиготним генотипом GG, 6 – негативний контроль (H<sub>2</sub>O)

За результатами молекулярно-генетичного дослідження встановлено розподіл генотипів за поліморфним алелем с.4524Т>G гена *LIF* в досліджуваній та контрольній групах (табл. 3.7). В досліджуваній групі пацієнтів з легкою інтелектуальною недостатністю нами було виявлено 11 індивідів (0,198) –



гомозигот за поліморфним алелем 4524G та 35 (0,494) гетерозиготних носіїв поліморфного алеля.

Таблиця 3.7

**Розподіл генотипів та алелів за мононуклеотидною заміною с.4524Т>G гена *LIF* у пацієнтів з легкою інтелектуальною недостатністю та в контрольній групі**

	Контрольна група, n = 250	Група пацієнтів з ІН, n = 64
Генотип, n (%)		
ТТ	113 (45,2)	18 (30,8)
TG	111 (44,4)	35 (49,4)
GG	26 (10,4)	11 (19,8)
TG+GG	137(54,8)	46(71,9)*
Алель, n (частота)		
Т	336 (0,672)	71 (0,555)
G	164 (0,328)	57 (0,445)*

Примітка. n – кількість індивідів; \* – різниця між значенням показника в досліджуваних групах є статистично достовірною ( $p < 0,05$ )

Мажорним в популяційній групі виявився гомозиготний за алелем дикого типу генотип 4524 ТТ (0,452), тоді як в групі пацієнтів з легкою ІН мажорним виявився гетерозиготний генотип 4524 TG (0,494).

Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним за даним поліморфним варіантом в групі індивідів з легкою ІН ( $\chi^2=0,03$ ;  $p=0,87$ ) та в контрольній групі ( $\chi^2=0,73$ ;  $p=0,39$ ) свідчив про випадковий розподіл генотипів у відповідності зі співвідношенням Харді-Вайнберга.

При порівнянні розподілу генотипів в дослідній та контрольній групах виявили, що частота мінорного алеля 4524G гена *LIF* в групі пацієнтів з легкою ІН (0,445) була достовірно ( $p=0,01$ ) вищою порівняно з контрольною групою (0,328). Більше того, за розрахунками показника відношення шансів, встановлено, що індивіди-носії мінорного 4524G гена *LIF* мають вдвічі вищий відносний ризик розвитку ІН ( $OR=2,11$ ; ДІ 95%: 1,16 – 3,84;  $p=0,01$ ).

Підсумовуючи дані, наведені в цьому підрозділі, зазначимо, що нами вперше було проаналізовано розподіл генотипів за алельними варіантами с.4524Т>G гена *LIF* у пацієнтів з легкою ІН. Встановлено, що алельний варіант с.4524Т>G гена *LIF*, обраний нами для аналізу, є ймовірним генетичним маркером ризику розвитку ІН.

#### **Основні результати пункту опубліковані в роботах:**

1. Association of the leukemia inhibitory factor gene polymorphism rs929271 with idiopathic mild intellectual disability / Gulkovskyi R. V., Volkova L. S., Livshits L. A. // *Biopolymers & cell* V. 31, №1, 2015, P. 34-37.
2. Аналіз rs929271 гена *LIF* в популяції України / Гулковський Р.В., Волкова Л. С. // Матеріали ІХ Міжнародної конференції молодих науковців “Біологія: від молекули до біосфери”, 18-20 листопада, 2014, Харків, Україна, С. 48-49.
3. *LIF* gene polymorphism rs929271 and association with idiopathic mild intellectual disability / R. Gulkovskyi, L. Volkova, L. Livshits // Abstracts of XI International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and Progress of Biology”, April 20-23, 2015. Lviv, Ukraine, P. 194-195
4. Leukemia inhibitory factor gene polymorphism rs929271 is associated with mild intellectual disability / Gulkovskyi R. V., Volkova L. S., Livshits L. A. // *European Journal of Human Genetics*, Vol. 23 Suppl. 1, European human genetics conference 2015, June 6 – 9, 2015, Glasgow, Scotland, United Kingdom, P. 153.

### 3.8. Дослідження поліморфізму гена *EPHA1* як фактора спадкової схильності розвитку легкої інтелектуальної недостатності

З метою виявлення можливої ролі алельного поліморфізму гена *EPHA1* в патогенезі ІН та як фактора спадкової схильності у пацієнтів з інтелектуальною недостатністю, нами було проведено молекулярно-генетичне дослідження поліморфних варіантів п.3022Т>С, п.1399Г>А в групі пацієнтів з ідіопатичною легкою інтелектуальною недостатністю (65 осіб) та в популяційній вибірці неспоріднених донорів з різних регіонів України (250 осіб), як контрольної групи. Молекулярно-генетичний аналіз поліморфізмів п.3022Т>С та п.1399Г>А гена *EPHA1* проводився на основі розроблених нами методів ПЛР (описаних в пункт 2.3.6.) з наступним рестрикційним аналізом методом ПДРФ.

Поліморфізм п.3022Т>С, що локалізований у регуляторній некодуючій послідовності *EPHA1-AS1* (*EPHA1 antisense RNA 1*) поряд з промотором гена *EPHA1*, являє собою транзицію – мононуклеотидну заміну тиміну на цитозин. Результатом даної заміни є виникнення одного з сайтів впізнавання для ендонуклеази рестрикції *RsaI*. Тому у індивідів без мононуклеотидної заміни Т>С ми спостерігаємо фрагмент довжиною 263 п.н., у гетерозиготних носіїв мононуклеотидної заміни спостерігаються рестрикційні фрагменти довжиною 263 п.н, 147 п.н. та 116 п.н., а у гомозиготних носіїв мононуклеотидної заміни – рестрикційні фрагменти довжиною 147 п.н. та 116 п.н.

Наявність продуктів ампліфікації та розділення фрагментів ПЛР продукту гена *EPHA1*, після гідролізу специфічною ендонуклеазою рестрикції *RsaI* аналізували за допомогою електрофорезу в 2%-му агарозному гелі (рис. 3.20).

Поліморфізм п.1399Г>А теж локалізований у регуляторній послідовності *EPHA1-AS1* (*EPHA1 antisense RNA 1*) і являє собою транзицію – мононуклеотидну заміну гуаніну на аденін. В ході дизайну та синтезу одного з праймерів (forward) нами були внесені некомплементарні основи таким чином,

щоб при ампліфікації алельного варіанта А утворювався один з сайтів впізнавання для специфічної ендонуклеази рестрикції *DraI*. Послідовності праймерів та температурно-часові умови проведення ПЛР наведені у пункті 2.3.6.

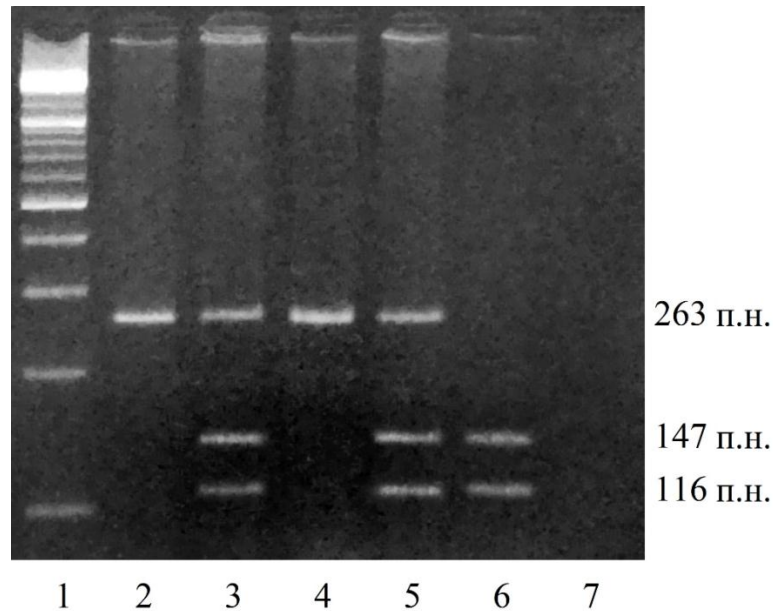


Рис. 3.20. Електрофореграма розділення фрагментів ПЛР-продукту гена *ERNA1*, що утворились після його гідролізу специфічною ендонуклеазою рестрикції *RsaI*: 1 – маркери молекулярної маси (з кроком 100 п.н.); 2, 4– індивіди, що мають генотип ТТ; 3, 5 – індивіди з генотипом ТС; 6 – індивід з генотипом СС; 7 – негативний контроль (H<sub>2</sub>O)

Таким чином, після гідролізу специфічною ендонуклеазою рестрикції, продукт ампліфікації мінорного алельного варіанта 1399А гена *ERNA1* буде розчеплений на два фрагменти, довжиною 96 п.н. та 26 п.н. Фрагмент розміром 26 п.н. нами не спостерігається через високу електрофоретичну рухливість (за час електрофорезу встигає вийти з агарозного гелю). Продукт ампліфікації алеля G (дикий тип), довжиною 122 п.н., гідролізу не підлягає. Відповідно, в зразках індивідів, які є гетерозиготними носіями МНЗ п.1399G>А, спостерігали два фрагменти довжиною 122 п.н. та 96 п.н. У носіїв мінорного алеля А в

гомозиготному стані на електрофореграмі візуалізується тільки один фрагмент довжиною 96 п.н. Наявність продуктів ампліфікації та розділення фрагментів ПЛР продукту гена *EPHA1*, після гідролізу специфічною ендонуклеазою рестрикції *DraI* аналізували за допомогою електрофорезу в 2%-му агарозному гелі (рис. 3.21).

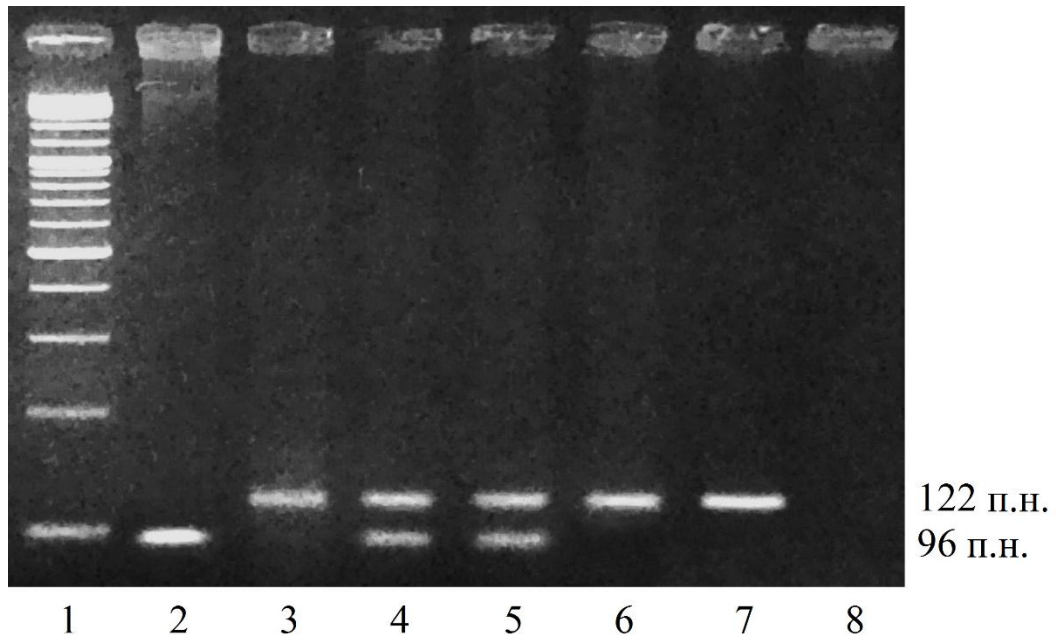


Рис. 3.21. Електрофореграма розділення фрагментів ПЛР-продукту гена *EPHA1*, що утворились після його гідролізу специфічною ендонуклеазою рестрикції *DraI*: 1 – маркери молекулярної маси (з кроком 100 п.н.); 2, – індивід, що має генотип AA; 4, 5 – індивіди з генотипом GA; 3, 6, 7 – індивіди з генотипом GG; 8 – негативний контроль ( $H_2O$ )

Отримані результати щодо розподілу частот генотипів і алельних варіантів за поліморфними локусами п.3022Т>С та п.1399Г>А гена *EPHA1* представлені в таблиці 3.8.

За результатами дослідження розподілу частот генотипів за алельним варіантом п.3022Т>С гена *EPHA1* в групі індивідів з ІН було встановлено, що

мажорним генотипом в даній групі, як і у популяційній вибірці, є гомозиготний за алелем дикого типу генотип 3022 ТТ (0,723).

Таблиця 3.8

**Розподіл генотипів та алелів за мононуклеотидними замінами п.3022Т>С та п.1399G>А гена *EPHA1* у пацієнтів з легкою інтелектуальною недостатністю та в контрольній групі**

	Контрольна група, n = 250	Група пацієнтів з ІН, n = 65
п.3022Т>С		
Генотип, n (%)		
ТТ	141 (56,4)	47 (72,3)
ТС	91 (36,4)	17 (26,2)
СС	18 (7,2)	1 (1,5)
ТС+СС	109(43,6)	18(27,7)*
Алель, n (частота)		
Т	373 (0,746)	111 (0,854)
С	127 (0,254)	19 (0,146)*
п.1399G>А		
Генотип, n (%)		
GG	96 (38,4)	31 (47,7)
GA	117 (46,8)	31 (47,7)
AA	37 (14,8)	3 (4,6)*
GG+AG	213 (85,2)	62 (95,4)*
Алель, n (частота)		
G	309 (0,618)	93 (0,715)
A	191 (0,382)	37 (0,285)*

Примітки: n – кількість індивідів; \* – різниця між значенням показника в досліджуваних групах є статистично достовірною ( $p < 0,05$ )

Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним за даним поліморфним варіантом в групі індивідів з легкою ІН ( $\chi^2=0,15$ ;  $p=0,7$ ) та в

контрольній групі ( $\chi^2=0,39$ ;  $p=0,53$ ), свідчив про випадковий розподіл генотипів у відповідності зі співвідношенням Харді-Вайнберга. При порівнянні розподілу генотипів в дослідній та контрольній групах виявили статистично достовірне ( $p=0,02$ ) перевищення частки носіїв мінорного алеля 3022С гена *EPHA1* в контрольній групі (0,436) порівняно з групою пацієнтів з легкою ІН (0,277). За розрахунками показника відношення шансів, встановлено, що індивіди-носії мінорного алеля 3022С мають вдвічі нижчий відносний ризик розвитку ІН ( $OR=0,5$ ; ДІ 95%: 0,27 – 0,9;  $p=0,02$ ).

За результатами молекулярно-генетичного дослідження встановлено розподіл генотипів за поліморфним варіантом п.1399G>А гена *EPHA1* в досліджуваній та контрольній групах. В популяційній групі мажорним виявився гетерозиготний генотип 1399 GA (0,468), тоді як в групі пацієнтів з легкою ІН гетерозиготний генотип 1399 GA та гомозиготний за алелем дикого типу генотип 1399 GG зустрічаються з однаковою частотою (0,477). Аналіз відповідності фактичних частот генотипів теоретично очікуваним за даним поліморфним варіантом в групі індивідів з легкою ІН ( $\chi^2=1,9$ ;  $p=0,17$ ) та в контрольній групі ( $\chi^2=0,02$ ;  $p=0,89$ ), свідчив про випадковий розподіл генотипів у відповідності зі співвідношенням Харді-Вайнберга.

За результатами порівняння розподілу генотипів за алельним варіантом п.1399G>А гена *EPHA1* в досліджуваній та популяційній групах було встановлено, що частота гомозиготного за мінорним алелем генотипу 1399 AA гена *EPHA1* була достовірно ( $p=0,03$ ) нижчою в групі пацієнтів з легкою ІН (0,046) порівняно з популяційним контролем (0,148). Більше того, за розрахунками показника відношення шансів, встановлено, що індивіди-носії мінорного алеля 1399А гена *EPHA1* мають суттєво нижчий відносний ризик розвитку ІН ( $OR=0,28$ ; ДІ 95%: 0,08 – 0,93;  $p=0,03$ ).

Підсумовуючи дані, наведені в цьому підрозділі, зазначимо, що нами вперше було проаналізовано розподіл генотипів за алельними варіантами п.3022Т>С та

n.1399G>A гена *EPHA1* у пацієнтів з легкою ІН та популяції України. Загалом, обидва досліджувані поліморфні варіанти гена *EPHA1* показали достовірну асоціацію з ІН при застосуванні різних генетичних моделей:

- рецесивної (ТТ vs ТС+СС) для n.3022Т>С, яка передбачає, що вплив на пенетрантність проявляється тільки для гомозигот за алелем схильності ( $\chi^2=5,43$ ;  $p=0,02$ ; OR = 0,50; ДІ 95%: 0,27 – 0,9),
- домінантної (GG+AG vs AA) для n.1399G>A, яка передбачає, що вплив на пенетрантність проявляється для гетерозигот і гомозигот за алелем схильності ( $\chi^2=4,83$ ;  $p=0,03$ ; OR = 0,28; ДІ 95%: 0,08 – 0,93).

Показано, що носійство мінорних алельних варіантів 3022С та 1399А гена *EPHA1* має протекторний ефект, що зумовлює знижений відносний ризик розвитку інтелектуальної недостатності.

#### **Основні результати пункту опубліковані в роботах:**

1. *EPHA1* gene SNPs analysis in population of Ukraine / Gulkovskyi R.V., Chernushyn S.Y., Kravchenko S.A., Bychkova G.M., Livshits L.A. // *Biopolymers & cell.* – 2013. – 29(5). – P. 506-510.
2. Association of the *EPHA1* gene polymorphism with idiopathic mild intellectual disability / Gulkovskyi R. V., Sivolob A.V., Livshits L. A. // *Biopolymers & cell.* – 2015. – 31(4). – P. 271-276.
3. *EPHA1* C1475T and C1891T polymorphisms in Ukrainian patients with idiopathic intellectual disability / R. V. Gulkovskyi, G.M. Bychkova, S.A. Kravchenko, N.V.Hryshchenko, S.Y. Chernushyn, M.Nõukas, M.Sauk, L. Milani, T. Pippucci, F. Balombo, C. Graziano, L. A. Livshits // *European Journal of Human Genetics*, Vol. 20 Suppl. 1, European human genetics conference 2013, June 8 – 11, 2013, Paris, France, P. 175
4. *EPHA1* as a new candidate gene for autosomal recessive non-syndromic intellectual disability / R. Gulkovskyi G. Volynets, S. Chernushyn, S.



Kravchenko, L. A. Livshits // European Journal of Human Genetics, Vol. 22 Suppl. 1, European human genetics conference 2014, May 31 – June 3, 2014, Milan, Italy, P. 153.

5. *EPHA1* as a new candidate gene for non-syndromic intellectual disability / R. Gulkovskyi G. Volynets, S. Chernushyn, S. Kravchenko, L. A. Livshits // ACTA Biochimica Polonica, Vol. 61 Suppl. 1, Abstracts of the BIO 2014 Congress, September 9-12, 2014, Warsaw, Poland, P. 120.

## РОЗДІЛ 4.

## ОБГОВОРЕННЯ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

За результатами секвенування екзому у обох пацієнтів з родини № 094 було виявлено зміни нуклеотидної послідовності: с.524С>Т (rs141416270) та с.1135\_1136insА (раніше не описана) в гені *SCEL*; с.585G>Т (rs146391418) та с.586С>Т (rs138503303) в гені *Cborf223*; с.806\_808СAТ>TGTGCA (rs386809049) в гені *ZNF527*; с.212A>G (раніше не описана) в гені *PUS3*; с.1475G>A (rs11768549) та с.1891G>A (раніше не описана) в гені *EPHA1*.

Проведене нами секвенування за Сенгером продуктів ПЛР генів *EPHA1*, *PUS3*, *ZNF527*, *SCEL* та *Cborf223* підтвердило результати повноекзомного секвенування пацієнтів та дозволило ідентифікувати генотипи їхніх батьків. З метою аналізу асоціації виявлених мутантних варіантів з ІН порівняльний аналіз змін нуклеотидної послідовності провели у хворих сибсів та їх здорових батьків.

Обидва пацієнти, а також їх здоровий батько виявилися гетерозиготними носіями мононуклеотидних замін (МНЗ) с.585G>Т та с.586С>Т в гені *Cborf223*, в той час як мати була гомозиготою за алелями дикого (рис. 3.4). Водночас, обидва пацієнти та їх здорова матір ідентифіковані як гетерозиготні носії мононуклеотидної заміни с.524С>Т (рис. 3.5) та мононуклеотидної інсерції с.1135\_1136insА (рис. 3.6) в гені *SCEL*, а батько – як гомозигота за алелями дикого типу (див. підрозділ 3.1.). Тому мононуклеотидна заміна с.524С>Т (rs141416270) та мононуклеотидна інсерція с.1135\_1136insА в гені *SCEL*, а також мононуклеотидні заміни с.585G>Т (rs146391418) та с.586С>Т (rs138503303) в гені *Cborf223*, були виключені нами зі списку потенційних кандидатів, залучених

в патогенез ІН, оскільки виявилося, що один зі здорових батьків має такі ж генотипи за мутаціями в генах *SCEL* та *Sborf223*, що і хворі сибси.

Також було встановлено, що обидва пацієнти мають гомозиготний генотип за заміною с.806\_808CAT>TGTGCA в гені *ZNF527*, в той час, як батько та мати є гетерозиготними носіями даної заміни (рис. 3.3). За заміною с.212A>G в гені *PUS3* обидва хворих сибси є гомозиготами, в той час, як батько є гетерозиготним носієм, а мати – гомозиготою за алелем дикого типу 212A (рис. 3.2). В даному випадку ми припускаємо, що в оогенезі матері мутація с.212A>G відбулася *de novo*. І на останок, обоє пацієнтів ідентифіковані як компаунди за двома несинонімічними мононуклеотидними замінами с.1475G>A та с.1891G>A в гені *EPHA1*, в той час як батько є гетерозиготним носієм заміни с.1891G>A, а мати – гетерозиготним носієм заміни с.1475G>A (рис. 3.1). Таким чином, за результатами сегрегаційного аналізу визначено, що гени *ZNF527*, *PUS3* та *EPHA1* можуть бути генами-кандидатами ІН у сибсів з родини № 094 (див. підрозділ 3.1.).

Ген *ZNF527* (Gene ID: 84503) людини розташований на довгому плечі 19-ої хромосоми в хромосомному локусі 19q13.1, складається з 4 екзонів та 3 інтронів [203, 204]. Для гена *ZNF527* на даний момент підтверджено наявність двох альтернативних сплайс-форм, проте найпоширенішим продуктом гена є білок (609 а.к.з.) *ZNF527*, що містить цинкові пальці (zinc finger protein 527) [203, 204]. Мутація с.806\_808CAT>TGTGCA (rs386809049) локалізована у кодуючій послідовності гена *ZNF527* і призводить до заміни двох а.к.з. на три – р.Pro269\_Tyr270delinsLeuCysAsn в міждоменній ділянці білка *ZNF527* (рис. 3.7).

Аналіз результатів проведеного нами множинного вирівнювання амінокислотних послідовностей білків-ортологів *ZNF527* показав, що а.к.з Pro269 та Tyr270 є еволюційно консервативними (див. підрозділ 3.2). Це вказує на їх можливу функціональну значимість. Таким чином, *ZNF527* може бути потенційним геном-кандидатом, мутації в якому асоційовані з ІН.

*ZNF527* є членом великої родини транскрипційних факторів – Kruppel C2H2-type zinc-finger protein family, – що містять Kruppel-асоційований бокс (Kruppel associated box – KRAB) і представлені тільки у тетрапод. Міссенс і нонсенс-мутації в ряді генів білків, що містять цинкові пальці залучені у патогенез X-зчеплених (*ZNF41*, *ZNF81*, *ZNF674*, *ZNF711*) [171-174] і аутосомних (*ZNF592*, *ZNF589*) [175, 176] форм несиндромальної інтелектуальної недостатності. Порушення функціонування генів підродини протеїнів ZNF-KRAB (*ZNF302*, *ZNF181*, *ZNF599* і *ZNF30*) може також бути причиною порушення інтелектуального розвитку при мікрodelеційному синдромі 19q13.11 [177].

Тому наступний етап наших досліджень був присвячений порівняльному аналізу розповсюдження алельних варіантів гена *ZNF527* за rs386809049 у групі 65 пацієнтів з легкою ідіопатичною ІН, у яких не виявлено відомих цитогенетичних і молекулярно-генетичних маркерів патогенезу ІН, та у контрольній групі (див. підрозділ 3.3.).

При порівнянні дослідної та контрольної груп у розподілі генотипів та алелів за заміною с.806\_808CAT>TGTGCA гена *ZNF527* достовірної різниці ( $p>0,05$ ) виявлено не було (табл. 3.1). В групі пацієнтів з легкою ІН було виявлено одного гомозиготного носія мінорного алеля TGTGCA гена *ZNF527*. Проте і в контрольній групі були виявлені три здорових індивіда з подібним генотипом. Оскільки саме цей генотип раніше ідентифіковано у сибсів з несиндромальною ІН, а частота мінорного алеля сягала 16,8% в контрольній групі, заміну с.806\_808CAT>TGTGCA в гені *ZNF527* було виключено зі списку потенційних кандидатів, залучених в патогенез ІН (див. підрозділ 3.3.).

Ген *PUS3* (Gene ID: 83480) людини локалізований на довгому плечі 11-ої хромосоми в хромосомному локусі 11q24.2, складається з 3 екзонів та 2 інтронів і кодує псевдоуридинсинтазу 3, до складу якої входить 481 а.к.з [245]. Вперше ідентифікована нами мононуклеотидна заміна с.212A>G в 1-му екзоні гена *PUS3*

призводить до амінокислотної заміни р.71Y>C, що локалізована в каталітичному домені псевдоуридинсинтази 3 людини. Псевдоуридин синтаза 3 є членом високо-консервативної родини тРНК-псевдоуридинсинтаз *truA* і каталізує перетворення уридину на псевдоуридин (Ψ) в 39 положенні антикодонових стебла та петлі (anticodon stem and loop – ASL) більшості ядерних тРНК [213, 214]. Ізомеризація уридину на псевдоуридин є модифікацією РНК, яка зустрічається найчастіше. Псевдоуридин, на відміну від уридину, здатен формувати додатковий водневий зв'язок, тому така модифікація призводить до збільшення стабільності молекули тРНК. Псевдоуридин у положеннях 38-40 в ASL тРНК відіграє важливу роль у забезпеченні ефективності і точності трансляції. Було показано, що ці модифікації призводять до підвищення термічної стабільності ASL, і є необхідними для формування коректної антикодон-кодонової взаємодії або конформаційних змін тРНК в процесах трансляції [215, 246-249]. Тобто ген *PUS3* є геном «домашнього господарства». Таким чином, мутації в гені *PUS3*, які призводять до втрати псевдоуридинсинтазної активності продукту гена і, як наслідок, псевдоуридину-39 у багатьох типах тРНК, можуть мати глобальний вплив на ефективність синтезу білка в організмі.

Аналіз результатів проведеного нами множинного вирівнювання амінокислотних послідовностей білків-ортологів показав, що тирозин у позиції 71 є високо-консервативним від *Escherichia coli* до людини (рис. 3.8). Це вказує на можливу функціональну значимість цього залишку. Використавши кристалічну структуру каталітичного домену мітохондріальної PUS1 людини як шаблон, ми провели комп'ютерне моделювання за гомологією просторових структур нормального та мутантного каталітичних доменів білка PUS3 людини. Це дало змогу з'ясувати, що заміна високо-консервативного ароматичного (див. підрозділ 3.2.) тирозину в 71 положенні на сірковмісний цистеїн локалізована в безпосередній близькості від активного центру білка PUS3 (~10Å від

каталітичного аспартату) і може призвести до змін в конформаційній гнучкості та просторовій організації каталітичного домену (рис. 3.9).

Проте, ми все ще не можемо стверджувати, що мутація p.71Y>C може призвести до зміни псевдоуридилатсинтазної активності білка PUS3 людини. Особливо враховуючи той факт, що Sibert et al. в експериментах із сайт-направленого мутагенезу PUS1 людини показали, що навіть залишки, безпосередньо залучені до утворення активного центру разом із критичним аспартатом 118 – Y173 (відповідає Y195 в PUS3) та R267 (відповідає R280 в PUS3), – не відіграють істотної ролі у каталізі [209]. В той же час, був продемонстрований сильний вплив відсутності псевдоуридинсинтазної активності на суттєве зниженням показників росту колоній прокариотів (*E. coli* та *S. typhimurium*) [216]. Також продемонстровано, що нокаутні за геном *PUS3* лінії дріжджів є життєздатними, але темпи росту відповідних колоній значно знижуються, особливо при температурі 37°C [250]. Якщо відсутність псевдоуридинсинтазної активності має такий ефект на ріст прокариот і дріжджів, яким може бути ефект важливих для каталітичної активності ферменту міссенс-мутацій в гені *PUS3* на організм людини?

Фізіологічне значення дисфункції псевдоуридинсинтаз можна оцінити на прикладі таких розладів, як DKC (dyskeratosis congenita – вроджений дискератоз) / синдром Hoyeraal-Hreidarsson та MLASA (mitochondrial myopathy and sideroblastic anemia – мітохондріальна міопатія та сидеробластна анемія) [217-220]. Міссенс-мутації в гені *PUS1* (мітохондріальний аналог *PUS3*) людини, які призводять до заміни консервативної амінокислоти Arg144 в активному центрі ферменту, та мутації амінокислоти Glu220 були ідентифіковані в якості детермінаторів рідкісного аутосомно-рецесивного синдрому MLASA [217-219]. Згадані мутації в гені *PUS1* призводять до втрати псевдоуридину в деяких тРНК, що знижує ефективність синтезу цілого ряду білків [217-219]. X-зчеплений вроджений дискератоз – інша відома мультисистемна патологія людини,

пов'язана з порушенням синтезу псевдоуридину, – викликається мутаціями в гені *DKC1*, що кодує дискерин [220, 251]. Мутації в гені *DKC1* також є причиною дуже рідкісного мультисистемного синдрому Hoyeraal-Hreidarsson [220, 251]. Таким чином, очевидно, що мутації в генах псевдоуридин синтаз, як і в інших генах «домашнього господарства», мають плейотропний ефект, а спричинені ними патології мають мультисистемний синдромальний характер.

Подібний плейотропний ефект мав би спостерігатися і у випадку ідентифікованої в ході даного дослідження гомозиготної мутації с.212A>G в гені *PUS3*, якщо б ця мутація впливала на каталітичну активність ферменту. Проте, фенотип обох обстежених нами сибсів з ІН має несиндромальний характер. Крім того, ні в анамнезі пацієнтів, ні в ході детального біохімічного аналізу крові (який не виявив відхилень від норми для основних груп білків плазми крові, амінокислот та ацилкарнітинів, проаналізованих за допомогою тандемної мас-спектрометрії) нами не було виявлено будь-яких доказів гіпопротеїнемії, яка є загальним симптомом для MLASA та DKC і могла б бути свідченням порушення синтезу білка. Тому ми схиляємося до думки, що мутація с.212A>G в гені *PUS3* є нейтральною і не може бути основною причиною ІН. Водночас, ми не можемо виключити, що мутація с.212A>G в гені *PUS3* може бути фактором спадкової схильності та/або модифікатором фенотипу при деяких патологіях, включаючи синдромальну інтелектуальну недостатність.

За результатами молекулярно-генетичного дослідження вперше отримано дані про розподіл частот генотипів та алельних варіантів за мутацією с.212A>G гена *PUS3* у популяції України (див. підрозділ 3.4.). Серед 250 проаналізованих в даному дослідженні зразків ми виявили лише одного гетерозиготного носія мутації с.212A>G, а частота мінорного алеля 212G склала 0,002. Ми не виявили заміну с.212A>G у жодного з 65 індивідів в групі пацієнтів з легкою інтелектуальною недостатністю. Таким чином, асоціації заміни с.212A>G в гені *PUS3* з патогенезом інтелектуальної недостатності доведено не було. Проте,

враховуючи низьку частоту алеля 212G (0,002) в популяції України і той факт, що амінокислотна заміна p.71Y>C знаходиться в безпосередній близькості від активного центру білка PUS3, ми не виключаємо, що мутація c.212A>G в гені *PUS3* може бути модифікатором фенотипу при деяких патологіях, включаючи синдромальну інтелектуальну недостатність (див. підрозділ 3.4.).

Ген *EPHA1* (Gene ID: 2041) людини локалізований на довгому плечі 7-ої хромосоми в хромосомному локусі 7q34 і складається з 18 екзонів та 17 інтронів [252]. Білковий продукт гена *EPHA1* молекулярною масою близько 108 кДа складається з 976 амінокислотних залишків [226]. У обох сибсів з несиндромальною ІН нами ідентифікована мононуклеотидна заміна c.1475G>A (rs11768549) в 7 екзоні у компаунді з заміною c.1891G>A (раніше не описана) в 11 екзоні гена *EPHA1*. Ці заміни призводять до амінокислотних змін: p.492R>Q – в фібронектиновому повторі III типу ектодомену та p.631G>R – в гліцин-багатому мотиві (P-loop) тирозинкіназного домену білка EPHA1 (див. підрозділ 3.2.).

За результатами проведеного нами множинного вирівнювання амінокислотних послідовностей білків-ортологів встановлено еволюційну консервативність амінокислот R492 та G631, що вказує на їх можливу функціональну значимість (рис. 3.10).

Комп'ютерне моделювання за гомологією просторових структур нормального та мутантного тирозинкіназного домену білка EPHA1 людини дало змогу з'ясувати, що амінокислотна заміна гліцину в 631 положенні на аргінін локалізована в АТФ-зв'язуючому сайті тирозинкіназного домену білка EPHA1 (рис. 3.13) і може призвести до зниження ефективності зв'язування АТФ. Бічна група аргініну в 631 положенні відстоїть в простір АТФ-зв'язуючого сайту EPHA1 і просторово ускладнює взаємодію з АТФ. Гліцин в 631 положенні є високо-консервативним і входить до числа амінокислотних залишків, що є критично важливими для формування АТФ-зв'язуючого сайту тирозинкіназ (рис.



3.14). Таким чином, ми можемо припустити, що мутація p.631G>R може призвести до зниження ефективності зв'язування АТФ і протеїнкіназної активності загалом.

Заміна позитивно зарядженої амінокислоти аргініну на глутамін в 492 положенні локалізована в фібронектиновому повторі III типу ектодомену ЕРНА1 (рис. 3.11), що виконує роль структурного спейсера і відіграє важливу роль у формуванні інтерфейсів протеїн-протеїнової взаємодії з білками-партнерами та лігандом. Комп'ютерне моделювання за гомологією просторових структур нормального та мутантного ектодомену білка ЕРНА1 людини дало змогу з'ясувати, що аргінін 492 в послідовності білка ЕРНА1 людини відповідає аргініну в 486 положенні ЕРНА4 (див. підрозділ 3.2.). Аргінін 486 в послідовності білка ЕРНА4 залучений у формування інтерфейсів протеїн-протеїнової взаємодії з білками-партнерами та лігандом при кластеризації ефринних рецепторів в процесах ефрин/ЕРН-сигналіngu (рис. 3.12) [200, 210]. Тому заміна позитивно зарядженої амінокислоти аргініну в 492 положенні на глутамін в ЕРНА1 може знизити ефективність зв'язування з лігандами або білками-партнерами і ефрин/ЕРН-сигналіngu загалом.

ЕРНА1 (Ephrin type-A receptor 1) є першим ідентифікованим членом найбільшої підродини рецепторних тирозинкіназ (РТК) – ефринних рецепторів або ЕРН-рецепторів (erythropoietin-producing hepatocellular receptors family), що відіграють ключову роль в процесах розвитку нервової системи [227]. Ефринні рецептори є інтегральними мембранними глікопротеїнами з єдиним трансмембранним доменом (ТМ), які активуються з утворенням гомодимерного комплексу. РТК підродини ЕРН та їх заякорені у мембрану ліганди, відомі як ефрини, беруть участь у регуляції таких біологічних процесів як ембріогенез, міграція та адгезія клітин, наведення аксонів, синаптична пластичність, ангиогенез та онкогенез [227-232].

Роль ЕРНА1 в процесах морфогенезу тканин висвітлена в дослідженнях його експресії, проведених на ембріонах миші, які показали, що патерн експресії ЕРНА1 динамічно змінюється в ході гастрюляції, нейруляції та ранніх періодів сомітогенезу [253]. Також було показано, що рівень експресії ЕРНА1 зростає в клітинах Пуркінє миші під час диференціації [254]. Окрім того, ЕРНА1 на високому рівні експресується в головному мозку дорослої людини [234, 235].

ЕРНА1 бере участь у прямому сигналінгу в клітинах, що експонують рецептор, і зворотньому сигналінгу в клітинах, що експонують ліганд, через взаємодію з глікозилфосфатидилінозитол-зв'язаними А-ефринами (GPI-linked A Ephrins), що загалом забезпечує зв'язок між сусідніми популяціями клітин, регуляцію процесів міграції клітин та аксонального наведення [226-232]. Варто відзначити, що основним сигнальним шляхом, через який реалізується ЕРНА1-сигналінг, є Rho-ГТФазний сигнальний шлях (див. підпункт 1.2.3.2.) [232-235]. Малі ГТФази родини Rho відіграють центральну роль у регуляції організації компонентів цитоскелету – таких, як мікротрубочки і актинові мікрофіламенти [134-136]. У нормі Rho-ГТФазний сигнальний шлях виконує безліч різноманітних функцій. Зокрема, в головному мозку цей шлях забезпечує ріст аксонів і трофічну підтримку дендритів, що формують постсинаптичні мембрани великої кількості синапсів, а також бере участь у регуляції екзоцитозу нейротрансмітерів [136-141]. Таким чином, Rho-ГТФазний сигнальний шлях грає ключову роль у реалізації синаптичної передачі. Значна кількість генів, які кодують білки, що беруть участь в клітинному сигналінгу через Rho-ГТФази або низхідні ефектори цього сигнального каскаду (*OPHN1*, *PAK3*, *ARHGEF6*, *LIMK1*, *FGD1*, *MEGAP* та *FMRI*) є детермінаторами деяких форм інтелектуальної недостатності та/або асоційовані з хворобою Альцгеймера [142-160]. Попередні дослідження показали, що ефрін-А1-індукована активація ЕРНА1 призводить до активації RhoA-кінази та інактивації ГТФази Rac1 [233]. Ці дослідження показують, що ЕРНА1-індуковане зниження активності кінази ІЛК може

призвести до гальмування активності білка альфа-PIX (*ARHGEF6*), що активує ГТФазу Ras1, і, як результат, – зсуву рівноваги між Rho-ГТФазами у бік підвищення активності RhoA-кінази [233]. Отже, є підстави розглядати *EPHA1* як перспективного гена-кандидата, асоційованого з ІН, білковий продукт якого залучений до розвитку та функціонування ЦНС.

Для оцінки розповсюдження МНЗ с.1475G>A та с.1891G>A гена *EPHA1*, виявлених у хворих сибсів з родини №094, проводився порівняльний аналіз розподілу генотипів та алельних варіантів в групі пацієнтів з легкою ІН та контрольній групі (див. підрозділ 3.5.).

За результатами даного дослідження заміна с.1891G>A не була виявлена у жодного з 315 індивідів, включених в дане дослідження, як в популяційній вибірці неспоріднених донорів з різних регіонів України (n=250), так і в групі пацієнтів з легкою інтелектуальною недостатністю (n=65). Крім того, мононуклеотидну заміну с.1891G>A не було ідентифіковано в жодній з популяцій, досліджених в ході таких проектів, як Exome Aggregation Consortium (URL: <http://exac.broadinstitute.org>), International HarMap Project (URL: <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) та 1000 Genomes Project (URL: <http://browser.1000genomes.org/>). Таким чином, ми припускаємо, що транзиція с.1891G>A в 11-му екзоні гена *EPHA1* є патогенною міссенс-мутацією, яка зустрічається з українською низькою частотою.

Що стосується нуклеотидної заміни с.1475G>A в гені *EPHA1*, у контрольній групі нами було виявлено лише 5 гетерозиготних носіїв мінорного алеля 1475A – його частота в популяції України становить 0,01 (табл. 3.5). Порівняння з частотами цього алеля в різних популяціях світу, отриманими в рамках проекту “1000 геномів” (табл. 4.1), дозволяє зробити висновок про відсутність суттєвих відмінностей у розповсюдженні даного варіанта в популяціях з населенням європейського походження та популяції України.

**Розподіл алельних варіантів за МНЗ с.1475G>А гена *EPHA1* в світових популяціях**

Популяція	Частота алеля 1475А
Азійська суперпопуляція	0
Американська суперпопуляція	0,014
Африканська суперпопуляція	0,003
Європейська суперпопуляція	0,016
Велика Британія	0,027
Іспанія	0,019
Італія	0,009
Нігерія	0
Кенія	0
Фінляндія	0,01
Пакистан	0,005
Пуерто-Ріко	0,014
Колумбія	0,032
Барбадос (негроїдної раси)	0,005
Юта (європейського походження)	0,015
Південний Захід США (афроамериканці)	0,025
Україна	0,01

Частота мінорного алеля 1475А гена *EPHA1* в групі пацієнтів з легкою ІН (0,038) була достовірно ( $p < 0,05$ ) вищою порівняно з контрольною групою (0,01). Більше того, за розрахунками показника відношення шансів встановлено, що індивіди-носії мінорного алеля 1475А гена *EPHA1* мають в 4 рази вищий відносний ризик розвитку ІН (OR= 4,05; ДІ 95%: 1,15 – 14,56;  $p=0,02$ ). Таким

чином, нами отримано дані на користь того, що МНЗ с.1475G>A (rs11768549) гена *EPHA1* може бути залученою до патогенезу ІН у хворих з родини №094 і її можна розглядати як імовірний фактор спадкової схильності до розвитку інтелектуальної недостатності.

На користь цього також можуть свідчити дані отримані в ході кількох GWAS-досліджень, в яких було виявлено асоціацію ідентифікованої нами заміни с.1475G>A (rs11768549), а також мутації rs202178565 та поліморфізмів rs11767557 і rs11771145 гена *EPHA1* з хворобою Альцгеймера – нейродегенеративним захворюванням, що супроводжується стійким порушенням когнітивних функцій (деменцією) в результаті органічного ураження мозку [221-225]. Встановлено, що мінорні алельні варіанти 3022C (rs11767557) та 1399A (rs11771145) гена *EPHA1* асоційовані зі зниженим відносним ризиком розвитку хвороби Альцгеймера. Також було показано, що варіант с.1475G>A гена *EPHA1* асоційований з швидкою прогресією деменції при хворобі Альцгеймера.

Ми вважаємо, що отримані дані про розподіл генотипів за МНЗ с.1475G>A та с.1891G>A в гені *EPHA1*, а також локалізація відповідних амінокислотних замін р.492R>Q та р.631G>R в консервативних мотивах функціонально важливих доменів залученого до розвитку та функціонування ЦНС рецептора *EPHA1*, є вагомими аргументами на користь того, що вперше ідентифікована нами мутація с.1891G>A в компаунді з мононуклеотидною заміною с.1475G>A (rs11768549) гена *EPHA1* є детермінуючим генетичним чинником інтелектуальної недостатності у пацієнтів з обстеженої родини №094.

Оскільки обоє пацієнтів мають компаундний генотип за двома несинонімічними МНЗ с.1475G>A та с.1891G>A в гені *EPHA1*, в той час, як здоровий батько є гетерозиготним носієм заміни с.1891G>A, а здорова мати – гетерозиготним носієм заміни с.1475G>A, ми констатуємо, що несиндромальна інтелектуальна недостатність у пацієнтів з обстеженої родини успадковується за аутосомно-рецесивним типом (див. підрозділ 3.1.). Аутосомно-рецесивний тип

успадкування також було попередньо встановлено за результатами аналізу родоводу родини № 094 (див. підрозділ 2.1.).

Ми пропонуємо ген *EPHA1* як потенційний, асоційований з Rho-ГТФазним сигнальним шляхом, ген-детермінатор інтелектуальної недостатності, білковий продукт якого залучений до розвитку та функціонування ЦНС.

Переважає більшість останніх досліджень, метою яких була ідентифікація генів-детермінаторів або генів-кандидатів ІН, були зосереджені на вивченні випадків помірної та важкої ІН. В той же час, легку інтелектуальну недостатність, частка якої становить 85% всіх випадків, розглядають як мультифакторне захворювання із спадковою схильністю. При цьому алельний поліморфізм відомих генів-кандидатів та генів-детермінаторів може бути фактором спадкової схильності до мультифакторних форм ІН. Виділений нами в ході даного дослідження як ген-детермінатор *EPHA1* був обраний для аналізу в якості гена схильності до мультифакторних форм інтелектуальної недостатності. За результатами проведеного нами біоінформатичного аналізу послідовності регуляторних ділянок гена *EPHA1*, на додачу до ідентифікованої в ході секвенування екзому двох хворих сибсів з несиндромальною ІН МНЗ с.1475G>A, нами були обрані для дослідження МНЗ п.3022T>C (rs11767557) та п.1399G>A (rs11771145) локалізовані у регуляторній некодуєчій послідовності *EPHA1-AS1* (*EPHA1 antisense RNA 1*) поряд з промотором гена як можливі чинники регуляції експресії *EPHA1*. На користь нашого вибору вказують дані кількох GWAS-досліджень, в яких було виявлено асоціацію поліморфізмів п.3022T>C та п.1399G>A гена *EPHA1* з нейродегенеративним захворюванням – хворобою Альцгеймера [221-223].

В якості ще одного генетичного чинника схильності до мультифакторних форм інтелектуальної недостатності може розглядатися ген *LIF*, що кодує нейроцитокін лейкоїя-інгібуючий фактор (LIF), який, як і ген *EPHA1*, є ключовим регулятором процесів ембріогенезу та нейрогенезу у ссавців [237-241].

Ген *LIF*, як і *EPHA1*, є частиною однієї з небагатьох відомих на сьогодні генних мереж, асоційованих з ІН, – ERK/MAP-кіназного сигнального шляху (див. підпункт 1.2.3.3.), який відіграє ключову роль у регуляції росту клітин, їх поділу та проліферації [240, 241]. Гени (наприклад, *RPS6KA3* та *SYNGAP1*), що кодують білки ERK/MAPK-шляху та його ефектори також були ідентифіковані в якості детермінаторів несиндромальної інтелектуальної недостатності [162, 255].

Аналіз послідовності регуляторних ділянок гена *LIF* дозволив нам обрати для дослідження поліморфізм с.4524Т>G (rs929271). Показано, що цей поліморфізм, який розташований в 3'-нетрансльованій області (3'-НТО) гена *LIF*, може спричинювати зменшення стабільності мРНК і, тим самим, впливати на рівень секреції LIF [242]. В попередніх дослідженнях було показано асоціацію поліморфізму с.4524Т>G з шизофренією та погіршенням функції робочої пам'яті [243, 244].

Отже, на наступних етапах наших досліджень, з метою пошуку факторів спадкової схильності розвитку інтелектуальної недостатності, ми провели порівняльний аналіз розподілу генотипів та алельних варіантів за поліморфними локусами с.4524 Т>G гена *LIF* (табл. 3.7), а також п.3022Т>С (rs11767557) і п.1399G>А (rs11771145) гена *EPHA1* (табл. 3.8) в групі пацієнтів з легкою ІН та контрольній групі. При порівнянні розподілу генотипів за алельними варіантами п.3022Т>С та п.1399G>А в дослідній та контрольній групах виявили статистично достовірне ( $p=0,02$ ) перевищення частки носіїв мінорного алеля 3022С гена *EPHA1* в контрольній групі (0,436) порівняно з групою пацієнтів з легкою ІН (0,277) (див. підрозділ 3.8.). Частота гомозиготного за мінорним алелем генотипу 1399АА гена *EPHA1* в контрольній групі (0,148) була достовірно ( $p=0,03$ ) вищою порівняно з групою пацієнтів з легкою ІН (0,046). Більше того, за розрахунками показника відношення шансів встановлено, що: індивіди-носії мінорного алеля 3022С гена *EPHA1* мають вдвічі нижчий відносний ризик розвитку ІН (OR=0,5; ДІ 95%: 0,27 – 0,9;  $p=0,02$ ); індивіди-носії мінорного алеля 1399А гена *EPHA1*

мають приблизно втричі нижчий відносний ризик розвитку ІН ( $OR=0,28$ ; ДІ 95%:  $0,08 - 0,93$ ;  $p=0,03$ ). Також було встановлено, що частота мінорного алеля 4524G гена *LIF* в групі пацієнтів з легкою ІН (0,445) є достовірно ( $p=0,01$ ) вищою порівняно з контрольною групою (0,328). За розрахунками показника відношення шансів встановлено, що: індивіди-носії мінорного алеля 4524G гена *LIF* мають вдвічі вищий відносний ризик розвитку ІН (див. підрозділ 3.7.).

Підсумовуючи вищенаведене, можемо стверджувати, що за результатами проведеного наукового дослідження вдалося отримати свідчення на користь залучення мутантних варіантів с.1475G>A та с.1891G>A гена *EPHA1* в патогенез інтелектуальної недостатності, що дозволяє нам виділити ген *EPHA1* в якості нового, асоційованого з Rho-ГТФазним сигнальним шляхом, гена-детермінатора цього захворювання. Встановлено, що алельні варіанти с.1475G>A гена *EPHA1* та с.4524T>G гена *LIF* є генетичними маркерами схильності до розвитку мультифакторних форм інтелектуальної недостатності. Також показано, що носійство мінорних алельних варіантів 3022C та 1399A гена *EPHA1* має протекторний ефект, що зумовлює знижений відносний ризик розвитку інтелектуальної недостатності.



## ВИСНОВКИ

Вирішення поставлених в даній роботі завдань дозволило ідентифікувати *EPHA1* як новий потенційний ген-детермінатор інтелектуальної недостатності та встановити асоціацію поліморфізмів с.1475G>A (rs11768549), п.3022T>C (rs11767557), п.1399G>A (rs11771145) гена *EPHA1* та с.4524T>G (rs929271) гена *LIF* із спадковою схильністю до розвитку інтелектуальної недостатності.

1. Вперше ідентифіковано міссенс мутації с.1891G>A в 11-му екзоні гена *EPHA1* та с.212A>G в 1-му екзоні гена *PUS3* та оцінено їх розповсюдженість в популяції здорового населення України.
2. Не виявлено асоціації мутацій с.524C>T (rs141416270) та с.1135\_1136insA в гені *SCEL*, с.585G>T (rs146391418) та с.586C>T (rs138503303) в гені *Sborf223*, с.806\_808CAT>TGTGCA (rs386809049) в гені *ZNF527* та с.212A>G в гені *PUS3* з патогенезом інтелектуальної недостатності.
3. Показано, що амінокислотні заміни р.492R>Q та р.631G>R локалізовані в високо-консервативних мотивах функціонально важливих доменів *EPHA1* і можуть призвести до зниження ефективності зв'язування з лігандами або білками-партнерами (р.492R>Q) та зв'язування АТФ з тирозинкіназним доменом (р.631G>R) і ефективності ефрин/*EPHA1*-сигналіну загалом.
4. Доведено, що носійство алельних варіантів 1475A (rs11768549) гена *EPHA1* та 4524G (rs929271) гена *LIF* є фактором спадкової схильності до розвитку інтелектуальної недостатності.
5. Показано, що носійство алельних варіантів 3022C (rs11767557) та 1399A (rs11771145) гена *EPHA1* має протекторний ефект, що зумовлює знижений відносний ризик розвитку інтелектуальної недостатності.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Leonard H. The epidemiology of mental retardation: Challenges and opportunities in the new millennium / Helen Leonard, Xingyan Wen // *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* – 2002. – Vol. 8, № 3. – P. 117–134.
2. Prevalence of intellectual disability: A meta-analysis of population-based studies / P.K. Maulik, M.N. Mascarenhas, C.D. Mathers [et al.] // *Res. Dev. Disabil.* – 2011. – Vol. 32. – P. 419–436.
3. Mefford H. Genomics, Intellectual Disability, and Autism / H. Mefford, M. Batshaw, E. Hoffman // *N. Engl. J. Med.* – 2012. – Vol. 366, № 8. – P. 733–743.
4. Moeschler J. Committee on Genetics. Comprehensive evaluation of the child with intellectual disability or global and developmental delays / John Moeschler, Michael Shevell // *Pediatrics.* – 2014. – Vol. 134, № 3. – P. 903–918.
5. Flint J. Genetic basis of cognitive disability / Jonathan Flint // *Dialogues Clin. Neurosci.* – 2001. – Vol. 3, № 1. – P. 37–46.
6. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision : [Instruction manual] / World Health Organization. – Geneva, edition 2010. – Vol. 1 – 685p.
7. Fraser Roberts J. The genetics of mental deficiency / J. Fraser Roberts // *Eugen. Rey.* – 1952. – Vol. 44, № 2. – P. 71–83.
8. Colchester revisited: a genetic study of mental defect / N. E. Morton, D. C. Rao, H. Lang-Brown [et al.] // *J. Med. Genet.* – 1977. – Vol. 14, № 1. – P. 1–9.
9. Katz G. Lazcano-Ponce E. Intellectual disability: definition, etiological factors, classification, diagnosis, treatment and prognosis / Gregorio Katz, Eduardo Lazcano-Ponce // *Salud Publica Mex.* – 2008. – Vol. 50, Suppl. 2. – P. 132–141.
10. King B.H. Comprehensive textbook of psychiatry. Intellectual disability / [B.H. King, K.E. Toth, R.M. Hodapp, E.M. Dykens] ; In: B.J. Sadock, V. A. Sadock, P. Ruiz editors [9th ed.]. – Philadelphia. : Lippincott Williams & Wilkins, 2009. – P. 3444–3474.
11. Bhawalkar J. A study of some etiological factors and morbid conditions in mentally handicapped children / J. Bhawalkar, N. Aswar, S. Wahab // *Indian J. Med. Sci.* – 1997. – Vol. 51, № 2. – P. 35–40.

12. Genetics and pathophysiology of mental retardation / J. Chelly, M. Khelifaoui, F. Francis, T. Bienvenu // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2006. – Vol. 14, № 6. – P. 701–713.
13. Tzschach A. Genetics of Mental Retardation / Andreas Tzschach, Hans-Hilger Ropers // *Dtsch. Arztebl.* – 2007. – Vol. 104, № 20. – P. 1400–1405.
14. Evaluation of mental retardation: recommendations of a Consensus Conference / C.J. Curry, R.E. Stevenson, D. Aughton [et al.] // *Am. J. Med. Genet.* – 1997. – Vol. 72, № 4. – P. 468–477.
15. Classification of intellectual disability using the Wechsler Intelligence Scale for Children: Full Scale IQ or General Abilities Index? / T. A. Koriakin, M. D. Mccurdy, A. Papazoglou [et al.] // *Dev. Med. Child Neurol.* – 2013. – Vol 55, № 9. – P. 840–845.
16. Kaufman L. The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review / L. Kaufman, A. Muhammad, J. Vincent // *J. Neurodev. Disord.* – 2010. – Vol. 2, № 4. – P. 182–209.
17. Актуальні проблеми соціально–реабілітаційної психіатрії в Україні / С. І. Табачников, Є. М. Горбань, Б. В. Михайлов [та ін.] // *Медицинские исследования.* – 2001. – Т. 1, № 1. – С. 6–8.
18. Стан психічного здоров'я населення та перспективи розвитку психіатричної допомоги в Україні / М. К. Хобзей, П. В. Волошин, Н. О. Марута // *Український вісник психоневрології.* – 2012. – Т. 20, № 3. – С. 13–18.
19. McLaren J. Review of recent epidemiological studies of mental retardation: prevalence, associated disorders, and etiology / Jennifer McLaren, Susan E. Bryson // *Am. J. Ment. Retard.* – 1987. – Vol. 92, № 3. – P. 243–254.
20. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation / A. Rauch, J. Hoyer, S. Guth [et al.] // *Am. J. Med. Genet. Part A.* – 2006. – Vol. 140, № 19. – P. 2063–2074.
21. Ellison J. Genetic basis of intellectual disability / J. Ellison, J. Rosenfeld, L. Shaffer // *Annu. Rev. Med.* – 2013. – Vol. 64. – P. 441–450.
22. A copy number variation morbidity map of developmental delay / G. M. Cooper, B. P. Coe, S. Girirajan [et al.] // *Nat. Genet.* – 2011. – Vol. 43, № 9. – P. 838–846.

23. Zahir F. The impact of array genomic hybridization on mental retardation research: a review of current technologies and their clinical utility / Farah Zahir, Jan Friedman // *Clin. Genet.* – 2007. – Vol. 72, № 4. – P. 271–287.
24. Consensus statement: Chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies / D.T. Miller, M.P. Adam, S. Aradhya [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2010. – Vol. 86, № 5. – P. 749–764.
25. Array analysis and karyotyping: workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands / R. Hochstenbach, E. van Binsbergen, J. Engelen [et al.] // *Eur. J. Med. Genet.* – 2009. – Vol. 52, № 4. – P. 161–169.
26. Ropers H.H. X-linked mental retardation / Hans-Hilger Ropers, Ben Hamel // *Nat. Rev. Genet.* – 2005. – Vol. 6, № 1. – P. 46–57.
27. Skuse D. Rethinking the nature of genetic vulnerability to autistic spectrum disorders / David H. Skuse // *Trends. Genet.* – 2007. – Vol. 23, № 8. – P. 387–395.
28. Nguyen D. Dosage compensation of the active X chromosome in mammals / Di Kim Nguyen, Christine M. Disteche // *Nat. Genet.* – 2006. – Vol. 38, № 1. – P. 47–53.
29. Down J.L. Observations on an ethnic classification of idiots / J. Langdon Down // *Clinical Lecture Reports, London Hospital.* – 1866. – Vol. 3. – P. 259–262.
30. Hickey F. Medical update for children with Down syndrome for the pediatrician and family practitioner / F. Hickey, E. Hickey, K. Summar // *Adv. Pediatr.* – 2012. – Vol. 59, № 1. – P. 137–157.
31. Patterson D. Molecular genetic analysis of Down syndrome / David Patterson // *Hum. Genet.* – 2009. – Vol. 126, № 1. – P. 195–214.
32. Weijerman M.E. Clinical practice. The care of children with Down syndrome / Michel E. Weijerman, J. Peter De Winter // *Eur. Jour. Pediatr.* – 2010. – Vol. 169, № 12. – P. 1445–1452.
33. Гончаренко Г. Б. Синдром дауна: частота, діагностика, медико-генетичне консультування / Г.Б. Гончаренко, Ю.В. Дудеріна, Ю.П. Синиця [ті ін.] // *Український науково-медичний молодіжний журнал.* – 2012. – № 1. – С. 45–48.

34. Twenty-year trends in the prevalence of Down syndrome and other trisomies in Europe: impact of maternal age and prenatal screening / M. Loane, J. Morris, M. Addor [et al.] // *Eur. J Hum. Genet.* – 2013. – Vol. 21, № 1. – P. 27–33.
35. Cytogenetic analysis of 1572 cases of Down syndrome: a report of double aneuploidy and novel findings 47,XY, t(14;21)(q13;q22.3)mat,+21 and 45,XX,t(14;21) in an Indian population / S. Mandava, N. Koppaka, V. Bhatia [et al.] // *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* – 2010. – Vol. 14, № 4. – P. 499–504.
36. Cytogenetic analysis of Down syndrome in Gujarat / F. Sheth, S. Rao, M. Desai [et al.] // *Indian.Pediatr.* – 2007. – Vol. 44, № 10. – P. 774–777.
37. Cytogenetic profile in 1,921 cases of trisomy 21 syndrome / F. Flores-Ramírez, C. Palacios-Guerrero, C. García-Delgado [et al.] // *Arch. Med. Res.* – 2015. – Vol. 46, № 6. – P. 484–489.
38. Down syndrome: clinical profile from India / M.P. Kava, M.S. Tullu, M.N. Muranjan [et al.] // *Arch. Med. Res.* – 2004. – Vol. 35, № 1. – P. 31–35.
39. Turner H. H. A syndrome of infantilism, congenital webbed neck, and cubitus valgus / Henry H. Turner // *Endocrinology.* – 1938. – Vol. 23, № 5. – P. 566–574.
40. Jacobs P. Turner syndrome: a cytogenetic and molecular study / P. Jacobs, P. Dalton, R. James // *Ann. Hum. Genet.* – 1997. – Vol. 61, № 6. – P. 471–483.
41. Prevalence, incidence, diagnostic delay, and mortality in Turner syndrome / K. Stochholm, S. Juul, K. Juel [et al.] // *J Clin. Endocrinol. Metab.* – 2006. – Vol. 91, № 10. – P. 3897–3902.
42. Turner syndrome: review of clinical, neuropsychiatric, and EEG status: an experience of tertiary center / K. Saad, A. Abdelrahman, Y. Abdel-Raheem [et al.] // *Acta. Neurol. Belg.* – 2014. – Vol. 114, № 1. – P. 1–9.
43. Klinefelter H. F. Klinefelter syndrome: historical background and development / Harry F. Klinefelter // *Southern Medical Journal.* – 1986. – Vol. 79, № 45. – P. 1089–1093.
44. Bojesen A. Prenatal and postnatal prevalence of Klinefelter syndrome: a national registry study / A. Bojesen, S. Juul, C. Gravholt // *J Clin. Endocrinol. Metab.* – 2003. – Vol. 88, № 2. – P. 622–626.
45. Klinefelter's syndrome / F. Lanfranco, A. Kamischke, M. Zitzmann [et al.] // *Lancet.* – 2004. – Vol. 364, № 9430. – P. 273–283.

46. Pregnancy outcomes in 188 French cases of prenatally diagnosed Klinefelter syndrome / N. Gruchy, F. Vialard, M. Decamp [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2011. – Vol. 26, № 9. – P. 2570–2575.
47. Khalifa M. M. Klinefelter syndrome is a common cause for mental retardation of unknown etiology among prepubertal males / M.M. Khalifa, J.L. Struthers // *Clin. Genet.* – 2002. – Vol. 61, № 1. – P. 49–53.
48. Intelligence and achievement in children with extra X aneuploidy: a longitudinal perspective / J. Rovet, C. Netley, J. [et al.] // *Am. J Med. Genet.* – 1995. – Vol. 60, № 5. – P. 356–63.
49. Rooman R.P. Growth and ovarian function in girls with 48,XXXX karyotype--patient report and review of the literature / R.P. Rooman, K. Van Driessche, M.V. Du Caju // *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* – 2002. – Vol. 15, № 7. – P. 1051–1055.
50. Penta-X syndrome. Report of a case with 47,XXX/48,XXXX/49,XXXXX mosaicism / L. Gómez-Valencia, P. Nájera-Martínez, A. Morales-Hernández [et al.] // *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* – 1989. – Vol. 46, № 6. – P. 417–421.
51. 48 XXXY variant of Klinefelter syndrome / G.L. Gupte, S.V. Kotvaliwale, J.V. Mahajan [et al.] // *Indian. Pediatr.* – 1995. – Vol. 32, № 7. – P. 798–801.
52. Lomelino C.A. 49,XXXXY syndrome: behavioural and developmental profiles / Cathy A. Lomelino, Allan L. Reiss // *J Med. Genet.* – 1991. – Vol. 28, № 9. – P. 609–612.
53. Mazauric-Stüker M. Y aneuploidy: a further case of a male patient with a 48,XYYY karyotype and literature review / M. Mazauric-Stüker, G. Kordt, D. Brodersen // *Ann. Genet.* – 1992. – Vol. 35, № 4. – P. 237–240.
54. Brain and behavior in 48, XYY syndrome / A.P. Hanley, J.D. Blumenthal, N. Raitano Lee [et al.] // *Neuroimage. Clin.* – 2015. – 15. – Vol. 8. – P. 133–139.
55. Cowie V.A. 49, XXXYY chromosome anomaly in a mentally retarded man / V.A. Cowie, K.R. Singh, R. Wheeler // *Br. J. Psychiatry.* – 1986. – Vol. 148, № 2. – P. 210–212.
56. Koolen, D.A., Pfundt, R., de Leeuw, N., , Genomic Microarrays in Mental Retardation: A Practical Workflow for Diagnostic Applications / D.A. Koolen,

- R. Pfundt, N. de Leeuw [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2009. – Vol. – 30, № 3. – P. 283–292.
57. Global variation in copy number in the human genome / R. Redon, S. Ishikawa, K.R. Fitch [et al.] // *Nature.* – 2006. – Vol. 444, № 7118. – P. 444–454.
58. Pfundt R. Structural genomic variation in intellectual disability / Rolph Pfundt, Joris A. Veltman // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 838. – P. 77–95.
59. The clinical application of array CGH for the detection of chromosomal defects in 20,126 unselected newborns / S.J. Park, E.H. Jung, R.S. Ryu [et al.] // *Mol. Cytogenet.* – 2013. – Vol. 6, № 1. – P. 21.
60. Chromosomal microaberrations in patients with epilepsy, intellectual disability, and congenital anomalies / A. Spreiz, E. Haberlandt, M. Baumann [et al.] // *Clin. Genet.* – 2014. – Vol. 86, № 4. – P. 361–366.
61. Cytogenomic mapping and bioinformatic mining reveal interacting brain expressed genes for intellectual disability / F. Xu, L. Li, V.P. Schulz [et al.] // *Mol. Cytogenet.* – 2014. – Vol. 7, № 1. – P. 4.
62. Etiologies and molecular mechanisms of communication disorders / S.D. Smith, E. Grigorenko, E. Willcutt [et al.] // *J. Dev. Behav. Pediatr.* – 2010. – Vol. 31, №7. – P. 555–563.
63. Genome arrays for the detection of copy number variations in idiopathic mental retardation, idiopathic generalized epilepsy and neuropsychiatric disorders: lessons for diagnostic workflow and research / R. Hochstenbach, J.E. Buizer-Voskamp, J.A.S. Vorstman, R.A. Ophoff // *Cytogenet. Genome Res.* – 2011. – Vol. 135, № 3-4. – P. 174–202.
64. Vissers L. Microdeletion and microduplication syndromes / Lisenka Vissers, Paweł Stankiewicz // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 838. – P. 29–75.
65. Microdeletion and microduplication syndromes / A. Weise, K. Mrasek, E. Klein [et al.] // *J. Histochem. Cytochem.* – 2012. – Vol. 60, № 5. – P. 346–358.
66. Jordan V.K. 1p36 deletion syndrome: an update / V.K. Jordan, H.P. Zaveri, D.A. Scott // *Appl. Clin. Genet.* – 2015. – Vol. 8. – P. 189–200.
67. Monosomy 1p36 – a multifaceted and still enigmatic syndrome: four clinically diverse cases with shared white matter abnormalities / E. Öiglanc-Shlik, S.

- Puusepp, I. Talvik [et al.] // *Eur. J. Paediatr. Neurol.* – 2014. – 18, № 3. – P. 338–346.
68. John C. P. Williams of Williams–Beuren syndrome / H.M. Lenhoff, R.L. Teele, P.M. Clarkson, W.E. Berdon // *Pediatr. Radiol.* – 2010. – Vol. – 41, № 2. – P. 267–269.
69. Marilee M. Developmental and cognitive troubles in Williams syndrome / Marilee Martens // *Handb. Clin. Neurol.* – 2013. – Vol. 111. – P. 291–293.
70. 3 Cases of partial deletion of the short arm of chromosome 5 / J. Lejeune, J. Lafourcade, R. Berger [et al.] // *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 1963. – Vol. 257. – P. 3098–3102.
71. Cri du chat syndrome: a critical review / Á. Rodríguez-Caballero, D. Torres-Lagares, A. Rodríguez-Pérez [et al.] // *Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal.* – 2010. – Vol. 15, № 3. – P. e473–478.
72. Hirschhorn K. Deletion of short arms of chromosome 4-5 in a child with defects of midline fusion. / K. Hirschhorn, H.L. Cooper, I.L. Firschein // *Humangenetik.* – 1965. – Vol. 1, № 5. – P. 479–482.
73. Bailey R. Wolf–Hirschhorn syndrome: a case study and disease overview / Regina Bailey // *Adv. Neonatal Care.* – 2014. – Vol. 14, № 5. – P. 318–21.
74. 22q11 Deletion syndrome: a review of some developmental biology aspects of the cardiovascular system / A. Restivo, A. Sarkozy, M.C. Digilio [et al.] // *J. Cardiovasc. Med.* – 2006. – Vol. 7, № 2. – P. 77–85.
75. Burnside R.D. 22q11.21 Deletion Syndromes: A Review of Proximal, Central, and Distal Deletions and Their Associated Features / Rachel D. Burnside // *Cytogenet. Genome Res.* – 2015. – Vol. 146, № 2. – P. 89–99.
76. Microdeletion syndrome 16p11.2–p12.2: clinical and molecular characterization / M.Hempel, N.Rivera Brugués, J. Wagenstaller [et al.] // *Am. J. Med. Genet. A.* – 2009 Oct. – Vol. 149A, № 10. – P. 2106–2112.
77. Further characterization of the new microdeletion syndrome of 16p11.2–p12.2 / A. Battaglia, A. Novelli, L. Bernardini [et al.] // *Am. J. Med. Genet. A.* – 2009. – Vol. 149A, № 6. – P. 1200–1204.
78. Martens M.A. Research Review: Williams syndrome: A critical review of the cognitive, behavioral, and neuroanatomical phenotype / Marilee A. Martens,



- Sarah J. Wilson, David C. Reutens // *J. Child Psychol. Psychiatry.* – 2008. – Vol. 49, № 6. – P. 576–608.
79. Paradowska–Stolarz A.M. Wolf–Hirschhorn syndrome (WHS) – literature review on the features of the syndrome / Anna M. Paradowska-Stolarz // *Adv. Clin. Exp. Med.* – 2014. – Vol. 23, № 3. – P. 485–489.
80. Angulo M.A. Prader–Willi syndrome: a review of clinical, genetic, and endocrine findings / M.A. Angulo, M.G. Butler, M.E. Cataletto // *J. Endocrinol. Invest.* – 2015. – Vol. 38, № 12. – P. 1249–1263.
81. Buiting K. Prader–Willi syndrome and Angelman syndrome / Karin Buiting // *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* – 2010. – Vol. 154C, № 3. – P. 365–376.
82. Epimutations in Prader–Willi and Angelman syndromes: a molecular study of 136 patients with an imprinting defect / K. Buiting, S. Gross, C. Lich [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2003. – Vol. 72, № 3. – P. 571–577.
83. Aycan Z. Prader–Willi syndrome and growth hormone deficiency / Zehra Aycan, Veysel Nijat Baş // *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.* – 2014. – Vol. 6, № 2. – P. 62–67.
84. Williams C.A., Driscoll DJ, Dagi AI. Clinical and genetic aspects of Angelman syndrome / C.A. Williams, D.J. Driscoll, A.I. Dagi // *Genet. Med.* – 2010. – Vol. 12, № 7. – P. 385-395.
85. Bird L.M. Angelman syndrome: review of clinical and molecular aspects / Lynne M. Bird // *Appl. Clin. Genet.* – 2014. – Vol. 7. – P. 93–104.
86. Curfs L.M. Prader–Willi syndrome: a review with special attention to the cognitive and behavioral profile / L. M. Curfs, Jean-Pierre Fryns // *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* – 1992. – Vol. 28, № 1. – P. 99–104.
87. Pirooznia M. Whole–genome CNV analysis: advances in computational approaches / M. Pirooznia, F.S. Goes, P.P. Zandi // *Front. Genet.* – 2015. – Vol. 6 – A. 138.
88. The PKU locus in man is on chromosome 12 / A.S. Lidksy, K.J. Robson, C. Thirumalachary [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 1984. – Vol. 36, № 3 – P. 527–533.

89. Scriver C. R. The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift / Charles R. Scriver // *Hum. Mutat.* – 2007. – Vol. 28, № 9 – P. 831–845.
90. Бариляк І.Р. Концептуальні засади виконання державної наукової програми “Захист генофонду населення України”/ І.Р. Бариляк, Ю.М. Стемпурський // *Матеріали ІІ з’їзду мед. генетиків України.* – Львів (Україна).– 1995. – С.15.
91. Афанасьєва Н.А. Розповсюдженість та клініко–генетична характеристика деяких моногенних хвороб у дітей автономної республіки Крим / Н.А. Афанасьєва // *Автореф. дис. ка–та мед. наук: УНГЦ.*– Київ, 1999.– С. 105
92. Afroze B. Genetics of non–syndromic autosomal recessive mental retardation / Bushra Afroze, Bushra Chaudhry // *J. Pak. Med. Assoc.* – 2013. – Vol. 63, № 1. – P. 106–110.
93. XLMR genes: update 2007 / P. Chiurazzi, C.E. Schwartz, J. Gecz, G. Neri // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2008. – Vol. 16, № 4. – P. 422–434.
94. Ropers H.H. Genetics of early onset cognitive impairment / Hans Hilger Ropers // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* – 2010 – Vol. 11. – P. 161–187.
95. Topper S. Exome sequencing and the genetics of intellectual disability / S. Topper, C. Ober, S. Das// *Clin. Genet.* – 2011. – Vol. 80, № 2. – P. 117–126.
96. Walker F.O. Huntington's disease / Francis O. Walker // *Lancet.* – 2007. – Vol. 369 , № 9557. – P. 218–228.
97. Sutherland G.R. Genetic counselling for neurological disorders / Grant R. Sutherland // *Aust. Fam. Physician.* – 1979. – Vol. 8, № 12.– P. 1265-1272
98. Fragile X syndrome / W. Saldarriaga, F. Tassone, L.Y. González-Teshima [et al.] // *Colomb. Med (Cali).* – 2014. – Vol. 45, № 4. – P. 190–198.
99. Oostra B.A. Review: the fragile X syndrome: isolation of the FMR–1 gene and characterization of the fragile X mutation / Ben A. Oostra, Annemieke J.M.H. Verkerk // *Chromosoma.* – 1992. – Vol. 101, №7.– P. 381–387.
100. A Multicenter Study on Genotype–Phenotype Correlations in the Fragile X Syndrome, Using Direct Diagnosis with Probe StB12.3: The First 2,253 Cases / F. Rousseau, D. Heitz, J. Tarleton [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* 1994. – Vol. 55, № 2. – P. 225–237.

101. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox / Y.H. Fu, D.P. Kuhl, A. Pizzuti [et al.] // *Cell.*– 1991.– Vol. 67, № 6.– P. 1047–1058.
102. Fragile X syndrome with FMR1 and FMR2 deletion / S. Moore, L. Strain, G. Cole [et al.] // *J. Med. Genet.* – 1999 – Vol. 36, № 7. – P. 565–566.
103. Two new cases of FMR1 deletion associated with mental impairment / M. Hirst, P. Grewal, A. Flannery [et al.] // *Am.J.Hum.Genet.* – 1995.– Vol. 56, № 1. – P. 67–74.
104. Mosaicism for the fragile X syndrome full mutation and deletions within the CGG repeat of the FMR1 gene / M. Milà, S. Castellví-Bel, A. Sánchez [et al.] // *J. Med. Genet.* – 1996.– Vol. 33, № 4. – P. 338–340.
105. Loesch D. Unstable mutations in the FMR1 gene and the phenotypes / Danuta Loesch, Randi Hagerman // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2012. – Vol. 769. – P. 78–114.
106. Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation / F. Rousseau, D. Heitz, V. Biancalana [et al.] // *N. Engl. J. Med.*– 1991.– Vol. 325, № 24.– P. 1673–1681.
107. Peprah E. Fragile X syndrome: the FMR1 CGG repeat distribution among world populations / Emmanuel Peprah // *Ann. Hum. Genet.* – 2012. – Vol. 76, № 2. – P. 178–191
108. Epidemiology of fragile X syndrome: A systematic review and meta-analysis / J. Hunter, O. Rivero-Arias, A. Angelov [et al.] // *Am. J. Hum. Genet. Part A.* – 2014.– Vol. 164, № 7. – P. 1648–1658.
109. Longitudinal Changes in Intellectual Development in Children with Fragile X Syndrome / S.S. Hall, D.D. Burns, A.A. Lightbody [et al.] // *J. Abnorm. Child Psychol.* – 2008.– Vol. 36, № 6. – P. 927–939.
110. Turner G. X-linked mental retardation, macroorchidism, and the Xq27 fragile site / G. Turner, A. Daniel, M. Frost // *J.Pediatr.*– 1980.– Vol. 96, № 5. – P. 837–841.
111. FMRP interferes with the Rac1 pathway and controls actin cytoskeleton dynamics in murine fibroblasts / M. Castets, C. Schaeffer, E. Bechara [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 2005. – Vol. 14, № 6. – P. 835–844.

112. Control of dendritic development by the *Drosophila* fragile X-related gene involves the small GTPase Rac1 / A. Lee, W. Li, K. Xu [et al.] // *Development*. – 2003. – Vol. 130, № 22. – P. 5543–5552.
113. Rescue of fragile X syndrome phenotypes in *Fmr1* KO mice by the small-molecule PAK inhibitor FRAX486 / B.M. Dolan, S.G. Duron, D.A. [et al.] Campbell // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2013. – 110, № 14. – P. 5671–5676.
114. Epidemiology of Rett syndrome in Serbia: prevalence, incidence and survival / A. Sarajlija, D. Kistic-Tepavcevic, Z. Nikolic [et al.] // *Neuroepidemiology*. – 2015. – Vol. 44, № 1. – P. 1–5.
115. Trends in the diagnosis of Rett syndrome in Australia / S. Fehr, A. Bebbington, N. Nassar [et al.] // *Pediatr. Res*. – 2011. – Vol. 70, № 3. – P. 313–319.
116. Neul JL, Kaufmann WE, Glaze DG, et al. Rett syndrome: revised diagnostic criteria and nomenclature / J.L. Neul, W.E. Kaufmann, D.G. Glaze [et al.] // *Ann. Neurol*. – 2010. – Vol. 68, № 6. – P. 944–950.
117. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2 / R.E. Amir, I.B. Van den Veyver, M. Wan [et al.] // *Nat. Genet*. – 1999. – Vol. 23, № 2. – P. 185–188.
118. Smeets E.E. Rett syndrome / E.E. Smeets, K. Pelc, B. Dan // *Mol. Syndromol*. – 2012. – Vol. 2, № 3-5. – P. 113–127.
119. MECP2 deletions and genotype–phenotype correlation in Rett syndrome / E. Scala, I. Longo, F. Ottimo [et al.] // *Am. J. Med. Genet. A* – 2007. – Vol. 143, № 23. – P. 2775–2784.
120. The association between behaviour and genotype in Rett Syndrome using the Australian Rett Syndrome Database / L. Robertson, S.E. Hall, P. Jacoby [et al.] // *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet*. – 2006. – Vol. 141B, № 2. – P. 177–183.
121. Liyanage V.R. Rett syndrome and MECP2 / Vichithra R.B. Liyanage, Mojgan Rastegar. // *Neuromolecular Med*. – 2014. – Vol. 16, № 2. – P. 231–264.
122. Spectrum of MECP2 gene mutations in a cohort of Indian patients with Rett syndrome: report of two novel mutations / D.K. Das, S. Raha, D. Sanghavi [et al.] // *Gene*. – 2013. – Vol. 515, № 1. – P. 78–83.

123. MECP2 mutations in children with and without the phenotype of Rett syndrome / K. Hoffbuhr, J.M. Devaney, B. LaFleur [et al.] // *Neurology*. – 2001. – Vol. 56, № 11. – P. 1486–1495.
124. Williamson S.L. Rett syndrome: new clinical and molecular insights / Sarah L. Williamson, John Christodoulou // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2006. – Vol. 14, № 8. – P. 896–903.
125. Large genomic rearrangements in MECP2 / K. Ravn, J.B. Nielsen, O.H. Skjeldal [et al.] // *Hum. Mutat.* – 2005. – Vol. 25, № 3. – P. 324.
126. Florian C. FOXP1-related disorders: from clinical description to molecular genetics / C. Florian, N. Bahi-Buisson, T. Bienvenu // *Mol. Syndromol.* – 2012. – Vol. 2, № 3-5. – P. 153–163.
127. Horn D. Mild to moderate intellectual disability and significant speech and language deficits in patients with FOXP1 deletions and mutations / Denise Horn // *Mol. Syndromol.* – 2012. – Vol. 2, № 3-5. – P. 213–216.
128. FOXP1 is responsible for the congenital variant of Rett syndrome / F. Ariani, G. Hayek, D. Rondinella [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2008. – Vol. 83, № 1. – P. 89–93.
129. Early onset seizures and Rett-like features associated with mutations in CDKL5 / J.C. Evans, H.L. Archer, J.P. Colley [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2005. – Vol. 13, № 10. – P. 1113–1120.
130. CDKL5/STK9 is mutated in Rett syndrome variant with infantile spasms / E. Scala, F. Ariani, F. Mari [et al.] // *J. Med. Genet.* – 2005. – Vol. 42, № 2. – P. 103–107.
131. Disruption of Netrin G1 by a balanced chromosome translocation in a girl with Rett syndrome / I. Borg, K. Freude, S. Kübart [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2005. – Vol. 13, № 8. – P. 921–927.
132. Isoform-specific toxicity of MECP2 in postmitotic neurons: suppression of neurotoxicity by FoxG1 / S.G. Dastidar, F.H. Bardai, C. Ma [et al.] // *J. Neurosci.* – 2012. – Vol. 32, № 8. – P. 2846–2855.
133. Weng S.M. Rett syndrome: from bed to bench / S.M. Weng, M.E.S Bailey, S.R. Cobb // *Pediatr. Neonatol.* – 2011. – Vol. 52, № 6. – P. 309–316.

134. Bustelo X.R. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: Regulation, effectors and functions in vivo / X.R. Bustelo, V. Sauzeau, I.M. Berenjano // *Bioessays*. – 2007. – Vol. 29, № 4. – P. 356–370.
135. Aspenström P. Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system / P. Aspenström, A. Fransson, J. Saras // *Biochem. J.* – 2004. – Vol. 377, № 2. – P. 327–337.
136. Ba W. Rho GTPase signaling at the synapse: implications for intellectual disability / W. Ba, J. van der Raadt, N.N. Kasri // *Exp. Cell Res.* – 2013. – Vol. 319, № 15. – P. 2368–2374.
137. Murakoshi H. Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines / H. Murakoshi, H. Wang, R. Yasuda // *Nature*. – 2011. – Vol. 472, № 7341. – P. 100–104.
138. Linseman D.A. Diverse roles of Rho family GTPases in neuronal development, survival, and death / Daniel A. Linseman, Frances Alexandra Loucks // *Front. Biosci.* 2008. – Vol. 13. – P. 657–676.
139. Spillane M. Involvement of Rho–family GTPases in axon branching / Mirela Spillane, Gianluca Gallo // *Small GTPases*. – 2014. – Vol. 5, № 1. – A. e27974.
140. Differential effects of Rho GTPases on axonal and dendritic development in hippocampal neurones / G. Ahnert-Hilger, M. Höltje, G. Grosse [et al.] // *J. Neurochem.* – 2004. – Vol. 90, № 1. – P. 9–18.
141. Nadif Kasri N. Rho–linked genes and neurological disorders / Nael Nadif Kasri, Linda Van Aelst // *Pflugers. Arch.* – 2008. – Vol. 455, № 5. – P. 787–797.
142. Oligophrenin 1 mutations frequently cause X–linked mental retardation with cerebellar hypoplasia / G. Zanni, Y. Saillour, M. Nagara [et al.] // *Neurology*. – 2005. – Vol. 65, № 9. – P. 1364–1369.
143. PAK in Alzheimer disease, Huntington disease and X–linked mental retardation / Q. L. Ma, F. Yang, S. A. Frautschy, G. M. Cole // *Cellular logistics*. – 2012. – Vol. 2, № 2. – P. 117–125.
144. PAK3 mutation in nonsyndromic X–linked mental retardation / K. M. Allen, J. G. Gleeson, S. Bagrodia [et al.] // *Nat. genet.* – 1998. – Vol. 20, № 1. – P. 25–30.

145. X-linked mild non-syndromic mental retardation with neuropsychiatric problems and the missense mutation A365E in PAK3 / A. K. Gedeon, J. Nelson, J. Gécz, J. C. Mulley // *Am. J. Med. Genet. A.* – 2003. – Vol. 120, № 4. – P. 509–517.
146. A mutation in PAK3 with a dual molecular effect deregulates the RAS/MAPK pathway and drives an X-linked syndromic phenotype / P. Magini, T. Pippucci, I. C. Tsai [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 2014. – Vol. 23, № 13. – P. 3607–3617.
147. Daniels R.H.  $\alpha$ Pix stimulates p21-activated kinase activity through exchange factor-dependent and-independent mechanisms / R.H. Daniels, F.T. Zenke, G.M. Bokoch // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274, № 10. – P. 6047–6050.
148. Lower K.M. Characterization of ARHGEF6, a guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases and a candidate gene for X-linked mental retardation: mutation screening in Börjeson–Forssman–Lehmann syndrome and MRX27 / Karen M. Lower, Jozef Gecz // *Am. J. Med. Genet.* – 2001. – Vol. 100, № 1. – P. 43–48.
149. Mutations in ARHGEF6, encoding a guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases, in patients with X-linked mental retardation / K. Kutsche, H. Yntema, A. Brandt [et al.] // *Nat. Genet.* – 2000. – Vol. 26, № 2. – P. 247–250.
150. Aarskog–Scott syndrome: Clinical update and report of nine novel mutations of the FGD1 gene / A. Orrico, L. Galli, L. Faivre [et al.] // *Am. J. Med. Genet. A.* – 2010. – Vol. 152, № 2. – P. 313–318.
151. Role of FGD1, a Cdc42 guanine nucleotide exchange factor, in epidermal growth factor-stimulated c-Jun NH2-terminal kinase activation and cell migration / T. Oshima, T. Fujino, K. Ando, M. Hayakawa // *Biol. Pharm. Bull.* – 2011. – Vol. 34, № 1. – P. 54–60.
152. Spectrum of Mutations in the OCRL1 Gene in the Lowe Oculocerebrorenal Syndrome / T. Lin, B. M. Orrison, A. M. Leahey [et al.] // *Am. J. Hum. Gen.* – 1997. – Vol. 60, № 6. – P. 1384–1388.
153. Characterization of 28 novel patients expands the mutational and phenotypic spectrum of Lowe syndrome / F. Recker, M. Zaniew, D. Böckenhauer [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* – 2015. – Vol. 30, № 6. – P. 931–943.
154. Loi M. Lowe syndrome / Mario Loi // *Orphanet J. Rare Dis.* – 2006. – Vol. 1. – A. 16.

155. The Lowe syndrome protein OCRL1 is involved in primary cilia assembly / B.G. Coon, V. Hernandez, K. Madhivanan [et al.] // *Hum. Mol. Genet.* – 2012. – Vol. 21, № 8. – P. 1835–1847.
156. Matsumoto N. Linking LIMK1 deficiency to hyperacusis and progressive hearing loss in individuals with Williams syndrome / N. Matsumoto, R. Kitani, F. Kalinec [et al.] // *Commun. Integr. Biol.* – 2011. – Vol. 4, № 2. – P. 208–210.
157. The novel Rho–GTPase activating gene MEGAP/srGAP3 has a putative role in severe mental retardation / V. Endris, B. Wogatzky, U. Leimer [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99, № 18. – P. 11754–11759.
158. Local protein synthesis and spine morphogenesis: Fragile X syndrome and beyond / A. W. Grossman, G. M. Aldridge, I. J. Weiler [et al.] // *J. Neurosci.* – 2006. – Vol. 26, № 27. – P. 7151–7155.
159. Bear M.F. The mGluR theory of fragile X mental retardation / M.F. Bear, K.M. Huber, S.T. Warren // *Trends Neurosci.*, – 2004. – Vol. 27, № 7. – P. 370–377.
160. CYFIP/Sra–1 controls neuronal connectivity in *Drosophila* and links the Rac1 GTPase pathway to the fragile X protein / A. Schenck, B. Bardoni, C. Langmann [et al.] // *Neuron.* – 2003. – Vol. 38, № 6. – P. 887–898.
161. Role of p21–activated kinase pathway defects in the cognitive deficits of Alzheimer disease / L. Zhao, Q. L. Ma, F. Calon [et al.] // *Nat. Neurosci.* – 2006. – Vol. 9, № 2. – P. 234–242.
162. Thomas G.M. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. / Gareth M. Thomas, Richard L. Huganir. // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2004. – Vol. 5, № 3. – P. 173–183.
163. Identification of novel mutations in the RSK2 gene (RPS6KA3) in patients with Coffin–Lowry syndrome / J.P. Delaunoy, A. Dubos, P. Marques Pereira, A. Hanauer // *Clin. Genet.* – 2006. – Vol. 70, № 2. – P. 161–166.
164. Coffin–Lowry syndrome / P. M. Pereira, A. Schneider, S. Pannetier [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2010. – Vol. 18, № 6. – P. 627–633.
165. Mutations in the RSK2(RPS6KA3) gene cause Coffin–Lowry syndrome and nonsyndromic X–linked mental retardation / M. Field, P. Tarpey, J. Boyle [et al.] // *Clin. Genet.* – 2006. – Vol. 70, № 6. – P. 509–515.



166. Mutations in SYNGAP1 in autosomal nonsyndromic mental retardation / F.F. Hamdan, J. Gauthier, D. Spiegelman [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2009. – Vol. 360, № 6. – P. 599–605.
167. De novo SYNGAP1 mutations in nonsyndromic intellectual disability and autism / F.F. Hamdan, H. Daoud, A. Piton [et al.] // *Biol. Psychiatry.* – 2011. – Vol. 69, № 9. – P. 898–901.
168. A novel de novo microdeletion spanning the SYNGAP1 gene on the short arm of chromosome 6 associated with mental retardation / A.C. Krepischi, C. Rosenberg, S.S. Costa [et al.] // *Am. J. Med. Genet. Part A.* – 2010. – Vol. 152A, № 9. – P. 2376–2378.
169. Pathogenic SYNGAP1 mutations impair cognitive development by disrupting maturation of dendritic spine synapses / J. P. Clement, M. Aceti, T. K. Creson [et al.] // *Cell.* – 2012. – Vol. 151, № 4. – P. 709–723.
170. Urrutia R. KRAB-containing zinc-finger repressor proteins / Raul Urrutia // *Genome Biol.* – 2003. – Vol. 4, №10. – A. 231.
171. Mutations in the ZNF41 gene are associated with cognitive deficits: identification of a new candidate for X-linked mental retardation / S.A. Shoichet, K. Hoffmann, C. Menzel [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2003. – Vol. 73, № 6. – P. 1341–1354.
172. ZNF674: a new Kruppel-associated box-containing zinc-finger gene involved in nonsyndromic X-linked mental retardation / D. Lugtenberg, H.G. Yntema, M.J. Banning [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2006. – Vol. 78, № 2. – P. 265–278.
173. Zinc finger 81 (ZNF81) mutations associated with X-linked mental retardation / T. Kleefstra, H.G. Yntema, A.R. Oudakker [et al.] // *J. Med. Genet.* – 2004. – Vol. 41, № 5. – P. 394–399.
174. A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation / P.S. Tarpey, R. Smith, E. Pleasance [et al.] // *Nat. Genet.* – 2009. – Vol. 41, № 5. – P. 535–543.
175. CAMOS, a nonprogressive, autosomal recessive, congenital cerebellar ataxia, is caused by a mutant zinc-finger protein, ZNF592 / E. Nicolas, Y. Poitelon, E. Chouery [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2010. – Vol. 18, № 10. – P. 1107–1113.

176. Exome sequencing identifies three novel candidate genes implicated in intellectual disability / Z. Agha, Z. Iqbal, M. Azam [et al.] // PLoS One. – 2014. – Vol. 9, № 11. – A. e112687.
177. 19q13.11 cryptic deletion: description of two new cases and indication for a role of WTIP haploinsufficiency in hypospadias / S. Gana, P. Veggiotti, G. Sciacca [et al.] // Eur. J. Hum. Genet. – 2012. – Vol. 20, № 8. – P. 852–856.
178. KRAB–Zinc Finger Proteins: A Repressor Family Displaying Multiple Biological Functions / A. Lupo, E. Cesaro, G. Montano [et al.] // Curr. Genomics. – 2013. – Vol. 14, № 4. – P. 268–278.
179. An anatomically comprehensive atlas of the adult human brain transcriptome / M. J. Hawrylycz, E. S. Lein, A. L. Guillozet–Bongaarts [et al.] // Nature. – 2012. – Vol. 489, № 7416. – P. 391–399.
180. Efficient strategy for the molecular diagnosis of intellectual disability using targeted high–throughput sequencing / C. Redin, B. Gérard, J. Lauer [et al.] // J. Med. Genet. – 2014. – Vol. 51, № 11. – P. 724–736.
181. Baker K. Genetic investigation for adults with intellectual disability: opportunities and challenges / K. Baker, F. L. Raymond, N. Bass // Curr. Opin. Neurol. – 2012. – Vol. 25, № 2. – P. 150–158.
182. Flore L.A. Updates in the genetic evaluation of the child with global developmental delay or intellectual disability / Leigh Anne Flore, Jeff M. Milunsky // Semin. Pediatr. Neurol. – 2012. – Vol. 19, № 4. – P. 173–180.
183. Human Connectome Project Informatics: quality control, database services, and data visualization / D.S. Marcus, M.P. Harms, A.Z. Snyder [et al.] // Neuroimage. – 2013. – Vol. 80. – P. 202–219.
184. Brain Genomics Superstruct Project initial data release with structural, functional, and behavioral measures / A.J. Holmes, M.O. Hollinshead, T.M. O’Keefe, [et al.] // Sci. Data. – 2015. – Vol. 2. – A. 150031.
185. Гильбух Ю.З. Тест–опросник личностной зрелости / Ю.З. Гильбух. – К. : Научно–практический центр "Психодиагностика и дифференцированное обучение", 1994. – 24 с.

186. Молекулярно–генетичне дослідження порушень природної та стимульованої овуляції / Г. Б. Лівшиць, С. А. Кравченко, П.Ф. Татарський [та ін.] // Цитология и генетика. – 2008. – Т. 42, № 2. – С. 63–69.
187. Sharma D. Expansion mutation frequency and CGG/GCC repeat polymorphism in FMR1 and FMR2 genes in an Indian population / D. Sharma, M. Gupta, B.K. Thelma // Genet. Epidemiol. – 2001. – Vol. 20, № 1. – P. 129–144.
188. A simple multiplex FRAXA, FRAXE, and FRAXF PCR assay convenient for wide screening programs / V. Strelnikov, M. Nemtsova, G. Chesnokova [et al.] // Hum. Mut. – 1999. – Vol. 13, № 2. – P.166–169.
189. Маниатис Т. Методы генетической инженерии Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук 1984. – 479 с.
190. Amplification refractory mutation system for prenatal diagnosis and carrier assesment in cystic fibrosis / C.R.Newton, C. Summers, M.J. Schwarz [et al.] // Lancet. – 1989. – Vol. 334, № 8678. – P.1481–1482.
191. Primer–directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase / R.K. Saiki, D.H. Gelfand, K.B. Mullis [et al.] // Science. – 1988. – Vol. 239, № 8580. – P. 487–491.
192. Wang K. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high–throughput sequencing data / K. Wang, M. Li, H. Hakonarson // Nucleic. Acids. Res. – 2010. – Vol. 38, № 16. – A. e164.
193. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation / N.A. O’Leary, M.W. Wright, J.R. Brister [et al.] // Nucleic. Acids. Res. – 2016. – Vol. 44, № D1. – P. 733–745.
194. Liu X. dbNSFP: A Lightweight Database of Human Nonsynonymous SNPs and Their Functional Predictions / X. Liu, X. Jian, E. Boerwinkle // Hum. Mut. – 2011. – Vol. 32, № 8. – P. 894–899.
195. Rousset F. Genepop’007: a complete re–implementation of the genepop software for Windows and Linux / F. Rousset // Mol. Ecol. Resour. – 2008. – Vol. 8, № 1. – P. 103–106.
196. Basic statistical analysis in genetic case–control studies / G.M. Clarke, C.A. Anderson, F.H. Pettersson [et al.] // Nat. Protoc. – 2011. – Vol. 6, № 2. – P. 121–133.

197. Szumilas M. Explaining odds ratios / M. Szumilas // *J. Can. Acad. Child Adolesc. Psychiatry.* – 2010. – Vol. 19, № 3. – P. 227–229.
198. Sullivan K. OpenEpi: a web-based epidemiologic and statistical calculator for public health / K. Sullivan, A. Dean, M. Soe // *Public Heal. Rep.* – 2009. – Vol. 124, № 3. – P. 471–474.
199. Balding D. A tutorial on statistical methods for population association studies / D.J. Balding // *Nat. Rev. Genet.* – 2006. – Vol. 7, № 10. – P. 781–791.
200. Structurally encoded intraclass differences in EphA clusters drive distinct cell responses. / E. Seiradake, A. Schaupp, D. del Toro Ruiz [et al.] // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 20, № 8. – P. 958–964.
201. Autoregulation by the juxtamembrane region of the human ephrin receptor tyrosine kinase A3 (EphA3) / T. L. Davis, J. R. Walker, P. Loppnau [et al.] // *Structure.* – 2008. – Vol. 16, № 6. – P. 873–884.
202. Huet T. Steroid receptor RNA activator (SRA) modification by the human pseudouridine synthase 1 (hPus1p): RNA binding, activity, and atomic model / T. Huet, F.A. Miannay, J.R. Patton, S. Thore // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, № 4. – A. e94610.
203. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XX. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro / T. Nagase, M. Nakayama, D. Nakajima // *DNA Res.* – 2001. – 8, № 2. – P. 85–95.
204. Generation and Initial Analysis of More than 15,000 Full-Length Human and Mouse cDNA Sequences / R.L. Strausberg, E.A. Feingold, L.H. Grouse [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99, № 26. – P. 16899–16903.
205. Hur S. How U38, 39, and 40 of many tRNAs become the targets for pseudouridylation by TruA / Sun Hur, Robert M. Stroud // *Mol. Cell.* – 2007. – Vol. 26, № 2. – P. 189–203.
206. The structural basis for RNA recognition and pseudouridine formation by pseudouridine synthase I / P.G. Foster, L. Huang, D.V. Santi, R.M. Stroud. // *Nat. Struct. Biol.* – 2000. – Vol. 7, № 1. – P. 23–27.
207. In Human Pseudouridine Synthase 1 (hPus1), a C-Terminal Helical Insert Blocks tRNA from Binding in the Same Orientation as in the Pus1 Bacterial

- Homologue TruA, Consistent with Their Different Target Selectivities / N. Czudnochowski, A.L. Wang, J. Finer-Moore, R.M. Stroud // *J. Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 425, № 20. – P. 3875–3887.
208. King R.D. An investigation into eukaryotic pseudouridine synthases / Ross D. King, Chuan Lu // *J. Bioinform. Comput. Biol.* – 2014 – Vol. 12, № 4. – P. 1450015.
209. Sibert B.S. Partial activity is seen with many substitutions of highly conserved active site residues in human Pseudouridine synthase 1 / B.S.Sibert, N. Fischel-Ghodsian, J.R. Patton // *RNA*. – 2008. – Vol. 14, № 9. – P. 1895–1906.
210. Insights into Eph receptor tyrosine kinase activation from crystal structures of the EphA4 ectodomain and its complex with ephrin-A5 / K.Xu, D. Tzvetkova-Robev, Y. Xu [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. – 2013. – Vol. 110, № 36. – P. 14634–14639.
211. An extracellular steric seeding mechanism for Eph-ephrin signalling platform assembly / E.Seiradake, K. Harlos, G. Sutton [et al.] // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 17, № 4. – P. 398–402.
212. Structures of the EphA2 Receptor at the Membrane: Role of Lipid Interactions / M. Chavent, E. Seiradake, E. Y. Jones, M. S. P. Sansom // *Structure*. – 2016. – Vol. 24, № 2. – P. 337–347.
213. Chen J. Pseudouridine synthase 3 from mouse modifies the anticodon loop of tRNA / Jianguang Chen, Jeffrey R. Patton // *Biochemistry*. – 2000. – Vol. 39, № 41. – P. 12723–12730.
214. Pus3p- and Pus1p-dependent pseudouridylation of steroid receptor RNA activator controls a functional switch that regulates nuclear receptor signaling / X. Zhao, J.R. Patton, S.K. Ghosh [et al.] // *Mol. Endocrinol.* – 2007. – Vol. 21, № 3. – P. 686–699.
215. Yu Y.T. Modifications of U2 snRNA are required for snRNP assembly and pre-mRNA splicing / Y.T. Yu, M.D. Shu, J.A. Steitz // *EMBO J.* – 1998. – Vol. 17, № 19. – P. 5783–5795.
216. Charette M. Pseudouridine in RNA: what, where, how, and why / Michael Charette, Michael W. Gray // *IUBMB life*. – 2000 – Vol. 49, № 5. – P. 341–351.

217. Missense mutation in pseudouridine synthase 1 (PUS1) causes mitochondrial myopathy and sideroblastic anemia (MLASA) / Y. Bykhovskaya, Casas K., E. Mengesha [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2004. – Vol. 74, № 6. – P. 1303–1308.
218. Nonsense mutation in pseudouridylate synthase 1 (PUS1) in two brothers affected by myopathy, lactic acidosis and sideroblastic anemia (MLASA) / E. Fernandez–Vizarra, A. Berardinelli, L. Valente [et al.] // *J. Med. Genet.* –2006. – Vol. 44, № 3. – P. 173–180.
219. Mitochondrial myopathy and sideroblastic anemia (MLASA): missense mutation in the pseudouridine synthase 1 (PUS1) gene is associated with the loss of tRNA pseudouridylation / J.R. Patton, Y. Bykhovskaya, E. Mengesha [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, № 20. – P. 19823–19828.
220. Mitchell J.R. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenital / J.R. Mitchell, E. Wood, K. Collins // *Nature.* – 1999. – Vol. 402, № 6761. – P. 551–555.
221. Genome–wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease / S. Seshadri, A.L. Fitzpatrick, M.A. Ikram [et al.] // *JAMA.* – 2010. – Vol. 303, № 18. – P. 1832–1840.
222. Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late–onset Alzheimer’s Disease / A.C. Naj, G. Jun, G.W. Beecham [et al.] // *Nat. Genet.* 2011. – Vol. 43, № 5. – P. 436–441.
223. Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA 1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer’s disease / P. Hollingworth, D. Harold, R. Sims [et al.] // *Nat. Genet.* – 2011. – Vol. 43, № 5. – P. 429–435.
224. Genetic determinants of disease progression in Alzheimer's disease / X. Wang, O.L. Lopez, R.A. Sweet [et al.] // *J Alzheimers Dis.* – 2015. – Vol. 43, № 2. – P. 649–655.
225. Rare coding mutations identified by sequencing of Alzheimer disease genome–wide association studies loci / B.N. Vardarajan, M. Ghani, A. Kahn [et al.] // *Ann. Neurol.* – 2015. – Vol. 78, № 3. – P. 487–498.
226. A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene / H. Hirai, Y. Maru, K. Hagiwara [et al.] // *Science.* – 1987. – Vol. 238, № 4834. – P. 1717–1720.

227. Kullander K. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling / Klas Kullander, Rüdiger Klein // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2002. – Vol. 3, № 7. – P. 475–486.
228. Himanen J.P. Eph receptors and ephrins / Juha–Pekka Himanen, Dimitar B. Nikolov // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2003. – Vol. 35, № 2. – P. 130–134.
229. Pasquale E.B. Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour / Elena B. Pasquale // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 6, № 6. – P. 462–475.
230. Wilkinson D.G. Eph receptors and ephrins: regulators of guidance and assembly / David G. Wilkinson // *Int. Rev. Cytol.* – 2000. – Vol. 196. – P. 177–244.
231. Poliakov A. Diverse roles of eph receptors and ephrins in the regulation of cell migration and tissue assembly / A. Poliakov, M. Cotrina, D.G. Wilkinson // *Dev. Cell.* – 2004. – Vol. 7, № 4. – P. 465–480.
232. Noren N.K. Eph receptor–ephrin bidirectional signals that target Ras and Rho proteins/ Nicole K. Noren, Elena B. Pasquale // *Cell Signal.* – 2004. – Vol. 16, № 6. – P. 655–666.
233. EphA1 interacts with integrin–linked kinase and regulates cell morphology and motility / T. Yamazaki, J. Masuda, T. Omori [et al.] // *J. Cell Sci.* – 2009. – Vol. 122, № 2. – P. 243–255.
234. EphrinA–EphA receptor interactions in mouse spinal neurulation: implications for neural fold fusion / N.M. Abdul–Aziz, M. Turmaine, N.D. Greene, A.J. Copp // *Int. J. Dev. Biol.* – 2009. – Vol. 53, № 4. – P. 559–568.
235. Expression of novel Alzheimer's disease risk genes in control and Alzheimer's disease brains / C.M. Karch, A.T. Jeng, P. Nowotny [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 11. – A. e50976.
236. Stranger B.E. Progress and promise of genome–wide association studies for human complex trait genetics / B.E. Stranger, E.A. Stahl, T. Raj // *Genetics.* – 2011. – Vol. 187, № 2. – P. 367–383.
237. Holmberg K.H. Leukemia inhibitory factor is a key regulator of astrocytic, microglial and neuronal responses in a low–dose pilocarpine injury model / Kristina H. Holmberg, Paul H. Patterson // *Brain. Res.* – 2006. – Vol. 1075, № 1. – P. 26–35.

238. Kerr B.J. Leukemia inhibitory factor promotes oligodendrocyte survival after spinal cord injury / Bradley J. Kerr, Paul H. Patterson // *Glia*. – 2005. – Vol. 51, № 1. – P. 73–79.
239. Leukaemia inhibitory factor is required for normal inflammatory responses to injury in the peripheral and central nervous systems in vivo and is chemotactic for macrophages in vitro / S. Sugiura, R. Lahav, J. Han [et al.] // *Eur. J. Neurosci.* – 2000. – Vol. 12, № 2. – P. 457–466.
240. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells / H. Niwa, K. Ogawa, D. Shimosato, K. Adachi // *Nature*. – 2009. – Vol. 460, № 7251. – P. 118–122.
241. Hirai H. Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor / Hirai Hiroyuki, Peter Karian, Nobuaki Kikyo // *Biochem. J.* – 2011. – Vol. 438, № 1. – P. 11–23.
242. Linkage disequilibrium and haplotype analysis among four novel single-nucleotide polymorphisms in the human leukemia inhibitory factor (LIF) gene / R. Ishida, Y. Ezura, H. Iwasaki [et al.] // *J. Hum. Genet.* – 2001. – Vol. 46, № 10. – P. 557–559.
243. Leukemia inhibitory factor gene is associated with schizophrenia and working memory function / Y. Okahisa, H. Ujike, H. Kunugi [et al.] // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. – 2010. – Vol. 34, № 1. – P. 172–176.
244. Kim Y. Multilocus genotypic association with vascular dementia by multifactor dimensionality reduction and entropy-based estimation / Kim Younyoung, Jungdae Park, Chaeyoung Lee // *Psychiatr. Genet.* – 2009. – Vol. 19, № 5. – P. 253–258.
245. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs / T. Ota, Y. Suzuki, T. Nishikawa [et al.] // *Nat. Genet.* – 2004. – Vol. 36, № 1. – P. 40–45.
246. Agris P.F. Decoding the genome: a modified view / Paul F. Agris // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – Vol. 32, № 1. – P. 223–238.
247. Tomita K. The presence of pseudouridine in the anticodon alters the genetic code: a possible mechanism for assignment of the AAA lysine codon as



- asparagine in echinoderm mitochondria / K. Tomita, T. Ueda, K. Watanabe // *Nucleic Acids Res.* – 1999. – Vol. 27, № 7. – P. 1683–1689.
248. Zerfass K. Pseudouridine in the anticodon G psi A of plant cytoplasmic tRNA(Tyr) is required for UAG and UAA suppression in the TMV-specific context / Zerfass Karin, Hildburg Beier // *Nucleic Acids Res.* – 1992. – Vol. 20, № 22. – P. 5911–5918.
249. Relaxation of a transfer RNA specificity by removal of modified nucleotides / V. Perret, A. Garcia, H. Grosjean [et al.] // *Nature.* – 1990. – Vol. 344, № 6268. – P. 787–789.
250. Characterization of yeast protein Deg1 as pseudouridine synthase (Pus3) catalyzing the formation of  $\Psi$ 38 and  $\Psi$ 39 in tRNA anticodon loop / F. Lecointe, G. Simos, A. Sauer [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273, № 3. – P. 1316–1323.
251. Hoyeraal–Hreidarsson syndrome with a DKC1 mutation identified by whole-exome sequencing / B. C. Lim, S. K. Yoo, S. Lee [et al.] // *Gene.* – 2014. – Vol. 546, № 2. – P. 425–429.
252. Owshalimpur D. Genomic structure of the EPHA1 receptor tyrosine kinase gene // D. Owshalimpur, M. J. Kelley // *Mol. Cell Probes.* – 1999. – Vol. 13, № 3. – P. 169–173.
253. Expression analysis of the EphA1 receptor tyrosine kinase and its high-affinity ligands Efna1 and Efna3 during early mouse development / S.L. Duffy, K.A. Steiner, P.P. Tam, A.W. Boyd // *Gene Expr. Patterns.* – 2006. – Vol. 6, № 7. – P. 719–723.
254. Saywell V. Developmental gene expression profile of axon guidance cues in Purkinje cells during cerebellar circuit formation. / Saywell Véronique, Jean-Michel Cioni, Fabrice Ango // *The Cerebellum.* – 2014. – Vol. 13, № 3. – P. 307–317.
255. Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity / J.J. Zhu, Y. Qin, M. Zhao [et al.] // *Cell.* – 2002. – Vol. 110, № 4. – P. 443–455.