



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2003130071/15, 21.03.2002

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.03.2002(30) Конвенционный приоритет:
21.03.2001 DE 10113876.8

(43) Дата публикации заявки: 10.04.2005

(45) Опубликовано: 10.11.2006 Бюл. № 31

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: WO 00/62781 A, 26.10.2000. WAERTGES
S. et al., Transcriptional upregulation of
the human serine-threonine Kinase hSGK1 in
glomerulonephritis, Kidney and blood pressure
research, 2000, v.23, №3-5, seite 246.(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:
21.10.2003(86) Заявка РСТ:
EP 02/03180 (21.03.2002)(87) Публикация РСТ:
WO 02/074987 (26.09.2002)Адрес для переписки:
101000, Москва, пер. Малый Златоустинский,
10, кв.15, "ЕВРОМАРКПАТ", Кузенковой Н.В.

(72) Автор(ы):

ЛАНГ Флориан (DE),
БУЗЯН Андреас (DE),
ЛУФТ Фридрих (DE)(73) Патентообладатель(и):
ЛАНГ Флориан (DE)

(54) КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГИПЕРТЕНЗИИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и касается способа диагностики *in vitro*, обусловленной генетическими факторами предрасположенности к гипертонии посредством выявления в образце (а) SNP, который выявляют в экзоне 8(C→T) гена *hsgk1* и представленном в SEQ ID NO:1, а также (б) SNP, который выявляют в интроне 6(T→C) гена *hsgk1* и локализованном во фрагменте размером 551 п.о. против хода

транскрипции по отношению к SNP в экзоне 8 согласно подпункту (а), или обоих SNP согласно подпунктам (а) и (б). Изобретение также относится к применению таких SNP для получения диагностикумов и наборов для диагностики обусловленной генетическими факторами предрасположенности к гипертонии. Преимущество изобретения заключается в обнаружении конкретных последовательностей гена *hsgk1*, обуславливающих предрасположенность к гипертонии. 3 н.п. ф-лы, 5 табл., 1 ил.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
G01N 33/48 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2003130071/15, 21.03.2002**
 (24) Effective date for property rights: **21.03.2002**
 (30) Priority:
21.03.2001 DE 10113876.8
 (43) Application published: **10.04.2005**
 (45) Date of publication: **10.11.2006 Bull. 31**
 (85) Commencement of national phase: **21.10.2003**
 (86) PCT application:
EP 02/03180 (21.03.2002)
 (87) PCT publication:
WO 02/074987 (26.09.2002)
 Mail address:
101000, Moskva, per. Malyj Zlatoustinskij,
10, kv.15, "EVROMARKPAT", Kuzenkovo N.V.

(72) Inventor(s):
LANG Florian (DE),
BUZJaN Andreas (DE),
LUFT Fridrikh (DE)
 (73) Proprietor(s):
LANG Florian (DE)

(54) **QUANTITATIVE DIAGNOSTIC ANALYSIS OF HYPERTENSION**

(57) Abstract:
 FIELD: medicine.
 SUBSTANCE: the present innovation deals with diagnostics in vitro hypertension diathesis caused with genetic factors due to detecting in a sample (a) SNP which should be detected in exon 8(C→T) of hsgk1 gene and presented in SEQ ID NO: 1, and also (B) SNP which should be detected in intron 6(T→C) of hsgk1 gene and localized in a fragment of 551 size being opposite the

transcription against SNP in exon 8 according to item (a), or both SNP according to items (a) and (b). The innovation refers, also, to application of such SNP for obtaining a diagnostic kits and sets for carrying out diagnostics of hypertension diathesis caused with genetic factors. The method provides concrete sequences of hsgk1 gene that cause hypertension diathesis.

EFFECT: higher accuracy and efficiency of diagnostic analysis.
 3 cl, 2 ex, 5 tbl

RU 2 287 160 C2

RU 2 287 160 C2

Настоящее изобретение касается прямой корреляции между сверхэкспрессией или функциональными молекулярными модификациями человеческих гомологов семейства *sgk* и гипертензией. В частности, изобретение относится к обнаружению прямой связи между двумя различными полиморфизмами отдельного нуклеотида (single nucleotide polymorphisms = SNP) в гене *hsgk1* и генетической предрасположенностью к гипертензии.

Многочисленные внеклеточные сигналы индуцируют внутриклеточные каскады фосфорилирования/дефосфорилирования, обеспечивающие быструю передачу этих сигналов от плазматической мембраны и ее рецепторов в цитоплазму и клеточное ядро. Специфичность этих обратимых каскадов трансдукции сигналов обеспечивается многочисленными отдельными протеинами, прежде всего киназами, которые переносят фосфатную группу на специфические субстраты.

Зависящую от сыворотки и глюкокортикоида киназу (*sgk*), серин/треонинкиназу, экспрессия которой повышается в присутствии сыворотки и глюкокортикоидов, сначала клонировали из клеток карциномы молочной железы крысы (Webster и др., 1993). Человеческую версию *sgk*, обозначенную как *hsgk1*, клонировали из клеток печени (Waldegger и др., 1997). Было установлено, что на экспрессию *hsgk1* можно воздействовать путем регуляции объема клетки. До настоящего времени не было обнаружено такой зависимости экспрессии крысиного *sgk* от объема клетки. Кроме того, было установлено, что крысиная киназа стимулирует эпителиальный Na^+ -каналы (ENaC) (Chen и др., 1999; Naray-Pejes-Toth и др., 1999). В свою очередь, ENaC играет решающую роль в выделении Na^+ почками. Повышенная активность ENaC приводит к увеличению задержания ионов натрия в почках и вследствие этого к развитию гипертензии.

Наконец, были клонированы два других представителя семейства человеческого гена *sgk*: *hsgk2* и *hsgk3* (Kobayashi и др., 1999), которые оба, так же, как и *hsgk1*, активируются инсулином и IGF1 посредством PI3-киназного пути. Результаты электрофизиологических экспериментов свидетельствуют о том, что совместная экспрессия *hsgk2* и *hsgk3* также приводит к повышению активности ENaC.

В DE 19708173 A1 описано, что *hsgk1* представляет собой эффективное средство для диагностики многих заболеваний, при которых изменения объема клетки играют решающую патофизиологическую роль, таких, например, как гиперантремия, гипоантремия, сахарный диабет, почечная недостаточность, гиперкатаболизм, печеночная энцефалопатия и бактериальные или вирусные инфекции.

В WO 00/62781 уже было описано, что активация эндотелиального Na^+ -канала с помощью *hsgk1* приводит к повышению почечной ресорбции Na^+ . Поскольку такое повышение ресорбции Na^+ в почках связано с гипертензией, то можно предположить, что повышенная экспрессия *hsgk1* может приводить к гипертензии, а пониженная экспрессия *hsgk1* в конце концов может приводить к гипотензии.

Аналогичная связь между сверхэкспрессией или гиперактивностью человеческих гомологов *hsgk2* и *hsgk3* и сверхактивацией ENaC, приводящей к повышенной почечной ресорбции Na^+ и развивающейся на основе этого гипертензии, описана также в неопубликованной имеющей более ранний приоритет заявке на немецкий патент, озаглавленной "sgk2 и sgk3 в качестве мишеней для диагностических и терапевтических целей" (внутреннее обозначение A 35 048) от 28.08.00. Кроме того, уже обсуждалась возможность использования киназ *hsgk2* и *hsgk3* для диагностики артериальной гипертензии.

В основу настоящего изобретения была положена задача выявить экспериментальным путем прямую корреляцию, т.е. прямую связь между сверхэкспрессией или функциональной молекулярной модификацией человеческих гомологов семейства *sgk* и гипертензией.

В контексте настоящего описания гомолог семейства *sgk*, который имеет вышеуказанную функциональную молекулярную модификацию, представляет собой гомолог семейства *sgk*, который подвергнут такой мутации, в результате которой изменяются свойства, прежде всего каталитические свойства или даже субстратную

специфичность соответствующего протеина.

Следующей задачей изобретения является использование этой прямой корреляции или связи между между сверхэкспрессией или функциональной молекулярной модификацией человеческих гомологов семейства *sgk* и гипертензией в способе диагностики

5 предрасположенности к обусловленной генетическими факторами форме гипертензии.

Согласно настоящему изобретению можно проводить обнаружение прямой корреляции между сверхэкспрессией или функциональной молекулярной модификацией человеческих генов *sgk* и гипертензией, и, в частности, она экспериментально доказана на примере гена *hsgk1*.

10 Таким образом, решение указанной выше задачи заключается в использовании этой прямой корреляции между сверхэкспрессией или функциональной молекулярной модификацией человеческих гомологов семейства *sgk*, прежде всего гена *hsgk1* gene, и гипертензией для диагностики обусловленной генетическими факторами формы гипертензии.

15 Решение указанной выше задачи заключается, в частности, в том, что при создании настоящего изобретения в гене *hsgk1* были идентифицированы два различных SNP, которые, если они присутствуют в конкретной версии гена *hsgk1*, вызывают у пациента определенную предрасположенность к гипертензии. Присутствие таких SNP в гене *hsgk1* или также в других человеческих гомологах семейства генов *sgk*, обнаруженное в

20 образцах, взятых из организма пациентов, может служить диагностическим показателем генетической предрасположенности к развитию гипертензии.

Кроме того, указанная выше задача решается с помощью предложенного в изобретении способа диагностики, позволяющего осуществлять количественный диагноз определенной формы генетической гипертензии, заключающийся в том, что сверхэкспрессию

25 человеческого гомолога семейства *sgk* или функциональную молекулярную модификацию этих гомологов выявляют путем количественного обнаружения гомологов в образце, взятом из организма пациента, с помощью антитела к протеинам гомологов или полинуклеотидов, которые могут гибридизоваться с ДНК или мРНК гомологов в строгих условиях, и набора для диагностики, пригодного для осуществления этого способа.

30 Набор по изобретению предпочтительно содержит антитела к протеину *hsgk1* или полипептиды, которые могут гибридизоваться с геном *hsgk1* в строгих условиях.

Такой набор для диагностики содержит, в частности, антитела, обладающие специфической активностью против областей протеина *hsgk1*, которые включают фрагмент протеина *hsgk1*, несущий мутацию в гене *hsgk1*, соответствующую определенному SNP.

35 Однако набор может содержать также антитела против наиболее часто встречающихся аллелей гена *hsgk1* или других гомологов семейства *sgk*, с помощью которых можно количественно определить модифицированный уровень экспрессии этих гомологов или *hsgk1*.

Кроме того, набор для диагностики по изобретению предпочтительно включает

40 полинуклеотиды, имеющие специфические области, содержащие одну или несколько версий связанных с гипертензией SNP в гене *hsgk1*, и таким образом пригодных для обнаружения специфических SNP в гене *hsgk1* путем гибридизации в строгих условиях с геномной ДНК, кДНК или мРНК, полученных из образцов, взятых из организма пациента.

Согласно настоящему описанию наличие прямой корреляции между гипертензией и

45 человеческими гомологами семейства *sgk* означает, что у некоторых пациентов могут происходить индивидуальные мутации генов *hsgk1*, *hsgk2* или *hsgk3*, приводящие к изменению уровня экспрессии или функциональных свойств киназ *hsgk1*, *hsgk2* или *hsgk3*, обуславливая тем самым вызванную генетическими факторами предрасположенность к гипертензии. Такие мутации могут возникать, например, в регуляторных областях гена

50 или также в интронных последовательностях в локусе гена *sgk* и вследствие этого вызывать сверхэкспрессию соответствующей киназы и сверхактивацию ENaC. С другой стороны, индивидуальные различия в генетической структуре локуса *sgk* могут влиять также на кодирующую область гена. Мутации в кодирующей области могут, кроме того,

приводить к функциональному изменению соответствующей киназы, например к изменению каталитических свойств киназы. Поэтому оба типа описанных выше мутаций могут вызывать повышенную активацию ENaC и, следовательно, в конце концов приводить к возникновению обусловленной генетическими факторами формы гипертензии у пациента.

5 Такие мутации в человеческих гомологах семейства *sgk*, которые вызывают развитие обусловленной генетическими факторами формы гипертензии у пациента, как правило, представляют собой так называемые полиморфизмы отдельного нуклеотида (SNP) либо в области экзона, либо в области интрона этих гомологов. SNP в области экзона генов *hsgk* могут, в их сравнительно редко встречающейся версии, которая в настоящем
10 описании названа мутантной версией, приводить к аминокислотным заменам в соответствующем протеине *hsgk* и следовательно к функциональной модификации киназы. SNP в области интрона или в регуляторных последовательностях генов *hsgk* в их мутантных версиях могут приводить к изменению уровня экспрессии соответствующей киназы.

15 При создании настоящего изобретения проводили исследование корреляции между наличием генотипа гена *hsgk1* у различных пациентов (близнецов) и величинами измеренного у них систолического и диастолического кровяного давления, которое в каждом случае измеряли при различных положениях тела (сидя, стоя, лежа), и производили статистический анализ.

20 При создании изобретения было установлено, что наличие замены (C→T) в экзоне 8 (1-ый SNP, см. SEQ ID NO.1) в обоих аллелях (гомозиготные TT-носители SNP в экзоне 8), которая не приводит к аминокислотной замене на уровне протеина (см. SEQ ID NO.2), обуславливает существенно более высокие уровни кровяного давления и тем самым генетическую предрасположенность к гипертензии (таблица 3).

25 Кроме того, было установлено, что замена (T→C) (2-ой SNP), локализованная на расстоянии 551 пар оснований от 1-го SNP в донорном сайте сплайсинга интрона 6 и экзона 7, в ее гомозиготной форме приводит к более низким величинам кровяного давления и тем самым к более слабой генетической предрасположенности к гипертензии (таблица 3).

30 Поскольку оба SNP в гене *hsgk1* по изобретению не приводят к аминокислотным заменам на уровне протеина, то вызываемая ими более или менее выраженная генетическая предрасположенность к гипертензии, по-видимому, обусловлена измененным уровнем экспрессии гена *hsgk1*.

35 Первый SNP в экзоне 8 (C→T) более подробно проиллюстрирован на чертеже. На чертеже представлены индивидуальные экзоны гена *hsgk1* и в каждом случае указаны номер экзона, идентификационный номер (ID) экзона, связанная с ним "непрерывная последовательность (sequence-contig)" и номер цепи, а также начало, конец и длина экзона. Точное положение замены (C→T) в рамке SNP в экзоне 8 обозначено с помощью черного маркера на букве C в экзоне 8. Светлая маркировка в экзоне 8 на чертеже
40 обозначает SNP-фланкирующую последовательность в гене *hsgk1*, которая однозначно определяет положение в геноме.

Второй SNP (T→C) в интроне 6 идентифицировали путем прямого секвенирования, и он однозначно характеризуется тем, что локализован в гене *hsgk1* (содержащем экзоны и интроны) точно на расстоянии 551 пары оснований от первого SNP в экзоне 8 против хода
45 транскрипции в донорном сайте сплайсинга интрона 6 и экзона 7 гена 1 и связан с заменой T на C.

Кроме того, было установлено, что все величины систолического и диастолического кровяного давления, измеренные у пациентов при различных положениях тела, в равной
50 мере зависят от генотипа гена *hsgk1* (таблица 4). Данные, приведенные в таблице 4, свидетельствуют о том, что корреляция между измеренным у пациентов кровяным давлением и встречаемостью указанных выше полиморфизмов (SNP) в их генах *hsgk1* действительно является статистически достоверной.

Кроме того, при анализе двух SNP в гене *hsgk1* был выявлен большой дисбаланс в

частоте их взаимной встречаемости (таблица 5). В то время как большинство СС-носителей SNP в экзоне 8 являются также ТТ-носителями SNP в интроне 6 (64%), обратное соотношение является другим (только 2% ТТ-носителей в экзоне 8 являются также СС-носителями в экзоне 6).

5 При создании изобретения впервые была установлена корреляция между кровяным давлением у пациентов и их индивидуальной генетической версией локуса гена hsgk1, которая свидетельствует о том, что специфические антитела или полинуклеотиды к hsgk1
10 можно применять для диагноза специфической генетической предрасположенности к гипертензии. Эта специфическая обусловленная генетическими факторами гипертензия может отличаться повышенной экспрессией hsgk1, т.е. сверхэкспрессией, или возможно также модифицированными функциональными свойствами hsgk1.

Поскольку две гомологичные киназы семейства sgk, т.е. hsgk2 и hsgk3, активируют также ENaC, то специфические антитела и полинуклеотиды по изобретению к hsgk2 или hsgk3 можно применять также для диагностического анализа определенных обусловленных
15 генетическими факторами форм гипертензии.

Сделанное при создании изобретения открытие, что встречаемость двух SNPs в гене hsgk1 коррелирует с предрасположенностью к гипертензии, свидетельствует, частности, о том, что полинуклеотиды, несущие ту или иную версию двух SNP в гене hsgk1, особенно предпочтительно применять для диагностики обусловленной генетическими факторами
20 формы гипертензии для гибридизации с эндогенной ДНК (кДНК или геномной ДНК) или мРНК, полученной из образца, выделенного из организма пациента. Аналогично этому представленные в настоящем описании данные свидетельствуют о том, что для диагностики генетической предрасположенности к гипертензии можно применять антитела к специфическим связанным с гипертензией полиморфизмам (SNP) в протеине hsgk1 или в
25 одном из его человеческих гомологов. Такие SNP, которые приводят также к связанному с гипертензией полиморфизму на уровне протеина, могут быть связаны, в частности, с функциональной модификацией протеина hsgk1 и тем самым обуславливать предрасположенность к гипертензии.

Настоящее изобретение относится также к использованию прямой корреляции, т.е. корреляции между сверхэкспрессией или функциональной молекулярной модификацией
30 человеческих гомологов семейства sgk, прежде всего hsgk1, и гипертензией, для количественного анализа определенной формы генетической гипертензии.

В частности, для количественного анализа определенной формы генетической гипертензии применяют два SNP в гене hsgk1, которые коррелируют с
35 предрасположенностью к гипертензии.

Кроме того, изобретение относится к способу количественной диагностики обусловленной генетическими факторами формы гипертензии, заключающемуся в том, что сверхэкспрессию человеческого гомолога семейства sgk или функциональную молекулярную модификацию этих гомологов выявляют путем количественного
40 обнаружения гомологов в образце, выделенном из организма пациента, с помощью антител к протеинам гомологов или полинуклеотидов, которые могут гибридизоваться с геномной ДНК, кДНК или мРНК гомологов в строгих условиях.

В этом способе диагностики по изобретению предназначенные для применения образцы, выделенные из организма пациента, предпочтительно представляют собой
45 образцы крови или образцы слюны, содержащие клеточный материал, и их можно выделять из организма пациента относительно дешевым методом. Можно применять, однако, и другие образцы, выделенные из организма пациента, которые также содержат клетки, например образцы ткани и т.д. Из этого содержащего клетки материала образцов, выделенных из организма, можно получать стандартными методами как геномную ДНК или
50 кДНК, а также мРНК (Sambrook J. и Russel D.W. Cold Spring Harbor, NY, изд-во CSHL Press, 2001), и при необходимости подвергать амплификации и последующей гибридизации в строгих условиях с полинуклеотидами, которые могут специфически гибридизоваться с указанной геномной ДНК, кДНК или также с мРНК. Кроме того, протеиновый экстракт можно

выделять также из содержащего клетки материала образцов, выделенных из организма (кровь, слюна, ткань и т.д.) с помощью стандартных методов (Sambrook J. и Russel D.W. Cold Spring Harbor, NY, изд-во CSHL Press, 2001), и затем соответствующий протеин sgk можно количественно обнаруживать путем инкубации с антителом к этому протеину.

5 В способе по изобретению предпочтительно применяют антитела к протеину hsgk1 или полинуклеотидам, которые могут гибридизоваться с геномной ДНК, кДНК или мРНК гена hsgk1.

В способе по изобретению применяют, в частности, полинуклеотиды, которые могут гибридизоваться в строгих условиях с геномной ДНК, кДНК или мРНК версии SNP в интроне 6 гена hsgk1 или версии SNP в экзоне 8 гена hsgk1. В контексте настоящего описания гибридикация в строгих условиях означает гибридикацию в таких условиях гибридикации с точки зрения температуры гибридикации и содержания формамида в растворе для гибридикации, уоторые описаны с соответствующей технической литературе (Sambrook J. и Russel D.W. Cold Spring Harbor, NY, изд-во CSHL Press, 2001).

15 Кроме того, объектом изобретения является набор для количественной диагностики определенной обусловленной генетическими факторами формы генетической гипертензии, включающий антитела к человеческим гомологам протеина семейства sgk, или полинуклеотидам, которые могут гибридизоваться в строгих условиях с человеческими гомологами гена семейства sgk, или такие антитела совместно с полинуклеотидами, 20 предназначенный для количественного определения сверхэкспрессии или функциональной молекулярной модификации этих гомологов.

Антитела, содержащиеся в наборе, предпочтительно представляют собой антитела к протеину hsgk1, а содержащиеся в наборе полинуклеотиды, предпочтительно обладают способностью гибридизоваться с геном hsgk1.

25 Наиболее предпочтительно набор для диагностики может содержать полинуклеотиды, которые могут гибридизоваться с геномной ДНК, кДНК или мРНК версии SNP в интроне 6 (T→C) или SNP в экзоне 8 (C→T).

Ниже изобретение более подробно проиллюстрировано на примерах.

Пример 1

30 Анализ корреляции проводили в группе, состоящей из 75 пар dizиготных близнецов (Busjahn и др., J. Hypertens., 14, 1996, сс.1195-1199; Busjahn и др., Hypertension, 29, 1997, с.165-170). Все участвовавшие в эксперименте индивидуумы принадлежали к германо-кавказской расе и происходили из различных областей Германии. Для проверки того, что они являются dizиготными, и для дальнейшего молекулярно-генетического 35 анализа у пар близнецов, а также у их родителей брали образцы крови. Перед этим проводили медицинское обследование каждого участвующего в эксперименте индивидуума. Ни у одного из индивидуумов, участвующего в эксперименте, не было выявлено хронического медицинского заболевания. У тестируемых индивидуумов после их нахождения в течение 5 мин в сидячем положении квалифицированный специалист 40 измерял кровяное давление с помощью стандартного ртутного сфигмоманометра (2 измерения с интервалом времени 1 мин). Среднее значение, полученное по двум измерениям, использовали в качестве величины кровяного давления.

Преимущество эксперимента на dizиготных близнецах с точки зрения исследования корреляции заключается в том, что они имеют совершенно одинаковый возраст и можно 45 считать, что внешние воздействия на их фенотипы являются минимальными (Martin и др., Nat. Genet., 17, 1997, с.387-392).

На важность исследований на близнецах для объяснения комплексных генетических заболеваний недавно было указано в работе Martin и др., 1997. Тот факт, что пары близнецов являлись dizиготными, подтверждали с помощью амплификации пяти 50 микросателлитных маркеров с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР). В этом анализе микросателлитные маркеры, представляющие собой фрагменты дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), амплифицировали с помощью ПЦР с использованием выделенных из организма различных людей специфических

олигонуклеотидов, содержащих высоковариабельные области. Высокую вариабельность этих областей генома можно обнаруживать по небольшим различиям размеров амплифицированных фрагментов, и, если существуют различия в соответствующем сайте гена, то после разделения продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза образуются двойные полосы, так называемые микросателлитные полосы (Becker и др., J. Reproductive Med., 42 1997, с.260-266).

Для молекулярно-генетического анализа гена-мишени, в данном случае гена hsgk1, с помощью ПЦР амплифицировали еще три микросателлитные маркерные области (d6s472, d6s1038, d6s270), расположенные в непосредственной близости от локуса hsgk1, и затем сравнивали с соответствующими образцами, выделенными из организма второго близнеца и родителей. Таким методом можно определять, имеют ли близнецы наследуемые идентичные или различные аллели (из числа рассматриваемых аллелей) по сравнению с их родителями. Корреляционный анализ проводили с использованием модели на основе так называемого "моделирования структурного уравнения" (SEM) (Eaves и др., Behav. Genet., 26, 1996, с.519-525; Neale, Mx: Statistical modeling. Box 126 MCV, Richmond, VA 23298: Department of Psychiatry, 4-е изд., 1997). Эта модель основана на использовании матриц дисперсий-ковариаций для тестируемых пар, которые отличаются вероятностью того, что они не имеют ни одного, имеют один или два идентичных аллеля. С точки зрения фенотипа вариация подразделяется на вариацию, генетически обусловленную всеми генами (A), вариацию, обусловленную геном-мишенью (Q), в рассматриваемом случае геном hsgk1, и вариацию, обусловленную внешними факторами (E).

$$VAR=A^2+Q^2+E^2$$

Для трех возможных аллельных комбинаций IBD₀, IBD_i, IBD_z (IBD означает "идентичный с потомком"; 0, 1 или 2 обозначают количество идентичных аллелей), ковариация тестируемой пары определяли следующим образом:

$$COV(IBD_0)=0,5A^2 \quad COV(IBD_1)=0,5A^2+0,5Q^2 \quad COV(IBD_2)=0,5A^2+Q^2$$

Для оценки корреляции между генетической структурой локуса hsgk1 и кровяным давлением тестируемого индивидуума различия между моделями, которые учитывают или не учитывают генетическую вариацию в отношении гена-мишени hsgk1, вычисляли с использованием статистического критерия χ^2 . Для каждой пары и для каждого локуса гена соотношения аллелей вычисляли с помощью так называемой "многоточечной" модели (MAPMAKER/SIBS; Kruglyak и др., Am. J. Hum. Genet., 57, 1995, с.439-454), основанной на использовании генотипов родителей.

Более высокая информативная ценность метода анализа, основанного на оценке дисперсий-ковариаций, по сравнению с описанным выше статистическим анализом, основанным на использовании χ^2 -критерия (S.A.G.E. Statistical Analysis for Genetic Epidemiology, Release 2.2. Computer program package, Department of Epidemiology and Bio statistics. Case Western Reserve University, Cleveland, OH, USA, 1996), была продемонстрирована недавно в исследовании на моделях (Fulker и др., Behav. Gen., 26, 1996, с.527-532). Для того, чтобы гарантировать значимый уровень корреляции в соответствии с критериями Lander и Kruglyak (Lander и др., Nat. Genet., 11, 1995, с.241-246), был принят уровень значимости (вероятность ошибки) $p < 0,01$.

Результаты этого исследования корреляции приведены в таблице 1.

Таблица 1		
Фенотип	max χ^2	P
Величина систолического кров ного давлени (лежа)	4,44	0,04
Величина диастолического кров ного давлени (лежа)	14,36	0,0002
Величина систолического кров ного давлени (сид)	5,55	0,019
Величина диастолического кров ного давлени (сид)	4,92	0,027
Величина систолического кров ного давлени (сто)	1,91	0,17
Величина диастолического кров ного давлени (сто)	4,83	0,028

Как видно из результатов, приведенных в таблице 1, низкие уровни значимости p,

которые лишь немного превышают принятый уровень значимости $p < 0,01$ или совсем не превышают его, свидетельствуют о наличии прямой корреляции между генетической дисперсией в сайте гена *hsgk1* и фенотипической дисперсией измеренного кровяного давления.

5 Пример 2

Структура генома гена *hsgk1* уже была описана ранее (Waldegger и др., Genomics, 51, 299 [1998]),

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=ENSG00000118515).

10 Для идентификации SNP, наличие которых связано с предрасположенностью к развитию гипертензии, сначала проводили изучение известных SNP в гене *hsgk1*, находящихся в банках данных, с точки зрения того, являются ли они истинными SNP, а не следствием ошибок секвенирования, и обладают ли SNP достаточным полиморфизмом для того, чтобы служить основой для диагностического определения предрасположенности к гипертензии. SNP rs 1057293 в экзоне 8, который связан с заменой С на Т, удовлетворял

15 сформулированным заранее необходимым требованиям

(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/snpview?snp=1057293;

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?type=rs&rs=1057293). Кроме того, прямым

20 секвенированием был идентифицирован второй SNP, локализованный в гене *hsgk1* точно на расстоянии 551 пары оснований от первого SNP в донорном сайте сплайсинга интрона 6 и экзона 7, и который связан с заменой Т на С. Эти два SNP в интроне 6 (Т→С) и в экзоне 8 (С→Т) анализировали согласно описанному ниже методу.

После ПЦР-амплификации для получения вырожденного ПЦР-прайма и дефосфорилирования ДНТФ в каждом случае добавляли 1 единицу щелочной фосфатазы и 1 единицу экзонуклеазы I. ПЦР проводили в следующих условиях: 95°C в течение 10

25 мин, затем 35 циклов при 95° в течение 15 с, затем 62°C в течение 15 с, затем 72°C в течение 30 с и стадия удлинения при 72°C в течение 10 мин в термоячейке типа 9600 Thermocycler (фирма Applied Biosystems).
 Реакции минисеквенирования проводили с использованием праймеров для SNP (Т→С) интрона 6: 5'-СТС СТТ GCA GAG TCC GAA и для SNP (С→Т) экзона 8: 5'-ACC AAG TCA

30 ТТС TGG GTT GC. 0,15 пмоля очищенного ПЦР-продукта использовали в качестве матрицы при ПЦР-секвенировании. Для ПЦР-секвенирования осуществляли 25 циклов амплификации, состоящих из следующих отдельных стадий: стадия денатурации в течение 10 с при 96°C, стадия отжига в течение 10 с при 50°C и стадия удлинения в течение 30 с

35 при 60°C в термоячейке типа 9600 Thermocycler.
 У тех пациентов, у которых был определен SNP-генотип гена *hsgk1*, измеряли систолическое и диастолическое кровяное давление в положении лежа, стоя и сидя для определения корреляции между SNP-генотипом гена *hsgk1* и кровяным давлением.
 В таблице 2 представлены некоторые демографические данные, касающиеся

40 близнецов, и результаты анализа корреляции между генетической структурой локуса гена *hsgk1* и измеренным кровяным давлением. Результаты свидетельствуют о том, что для подвергавшихся исследованию индивидуумов кровяное давление, измеренное во всех положениях, существенно зависит от генетических факторов.

Таблица 2				
Фенотип	Монозиготные близнецы	Дизиготные близнецы	a^2 ($r_{\text{монозиг}}/r_{\text{дизиг}}$)	p (коррел ци)
N	200	132		
Возраст у	29±12	31±12		
Пол (М/Ж)	52/148	85/47		
Рост (см)	169±8	170±8		
Вес (кг)	65±11	67±12		
Фенотип	Монозиготные близнецы	Дизиготные близнецы	a^2 ($r_{\text{монозиг}}/r_{\text{дизиг}}$)	P (коррел ци)
Индекс массы тела (BMI) вес/рост ² (кг/м)	22,4±3,5	22,8±3,4		
Систолическое кров ное давление (лежа) (мм рт.столба)	128±17	124±14	0,69 (0,69/0,31)	0,04
Диастолическое кров ное давление (лежа) (мм рт.столба)	71±12	71±11	0,66 (0,66/0,42)	0,0002

Систолическое кров ное давление (сид) (мм рт.столба)	125±16	123±13	0,74 (0,74/0,38)	0.019
Диастолическое кров ное давление (сид) (мм рт.столба)	73±11	73±10	0,72 (0,72/0,51)	0,027
Систолическое кров ное давление (сто) (мм рт.столба)	124±15	122±14	0,67 (0,66/0,48)	0,04
Диастолическое кров ное давление (сто) (мм рт.столба)	80±10	79±10	0,64 (0,63/0,40)	0,0002

5 В таблице 3 приведены дополнительные результаты опытов по оценке корреляции, полученные при создании изобретения. Установлено, что частоты встречаемости в аллелях для SNP в экзоне 8 составляют для С 91% и для Т 9% соответственно, а для SNP в интроне 6 они составляют для Т 79% и для С 21% соответственно (для обоих полиморфизмов поддерживается равновесие Харди-Вайнберга).

10 Результаты измерения кровяного давления во всех положениях (сидя, лежа, стоя) характеризуются одинаковой тенденцией. Величины кровяного давления у гомозиготных СС-носителей и гетерозиготных СТ-носителей SNP в экзоне 8 не отличаются друг от друга, однако для них характерно существенно более низкое систолическое и диастолическое кровяное давление, чем для гомозиготных ТТ-носителей SNP в экзоне 8.

15 Соответствующие результаты анализа корреляции для SNP в интроне 6 являются менее статистически достоверными по сравнению с SNP в экзоне 8. Однако было установлено, что гомозиготные СС-носители SNP в интроне 6 в целом характеризуются более низкой величиной кровяного давления, чем гомозиготные ТТ-носители и гетерозиготные ТС-носители SNP в интроне 6.

20

Фенотип	1-ый SNP в экзоне 8 СС	1-ый SNP в экзоне 8 СТ	1-ый SNP в экзоне 8 ТТ	1-ый SNP в экзоне 8 СС/СТ	2-й SNP в интроне 6 ТТ	2-й SNP в интроне 6 СТ	2-й SNP в интроне 6 СС	2-й SNP в интроне 6 ТТ/СТ
Систолическое кров ное давление (лежа)	125±15	125±18	132±14	125±16	125±16	128±18	119±6	126±16
25 Диастолическое кров ное давление (лежа)	70±10	72±13	74±12	71±11	71±10	72±13	67±10	71±11
Систолическое кров ное давление(сид)	124±14	123±15	129±13	124±14	124±14	125±17	117±6	124±14
Диастолическое кров ное давление (сид)	72±10	74±10	79±9	73±10	73±10	74±11	72±9	73±10
30 Систолическое кров ное давление (сто)	123±15	123±14	129±13	123±15	123±14	126±16	119±8	123±15
Диастолическое кров ное давление (сто)	79±10	81±10	84±8	80±10	80±10	82±11	78±8	80±10

35 Результаты, представленные в таблице 4, убедительно свидетельствуют о том, что генетическая организация SNP в интроне 6 практически одинаково достоверно влияет как на величину систолического, так и диастолического давления независимо от положения, в котором производили измерение кровяного давления (сидя, стоя, лежа). Результаты, свидетельствующие о важности генетической организации SNP в экзоне 8, являются сходными, однако достоверность связи между величинами систолического и диастолического кровяного давления, измеренными в различных положениях, несколько меньше, чем для SNP в интроне 6.

40

Фенотип	2-й SNP в интроне 6	1-й SNP в экзоне 8
Систолическое кров ное давление (лежа)	<0,01	<0,05
45 Диастолическое кров ное давление (лежа)	<0,05	0,08
Систолическое кров ное давление (сид)	0,05	<0,05
Диастолическое кров ное давление (сид)	<0,01	0,08
Систолическое кров ное давление (сто)	<0,05	0,07
Диастолическое кров ное давление (сто)	0,05	0,09

50 Как следует из данных, представленных в таблице 5, существует выраженное корреляционное равновесие между двумя анализируемыми SNP: в то время как большинство СС-носителей SNP в экзоне 8 являются также ТТ-носителями SNP в интроне 6 (64%), обратное соотношение не является таковым (только 2% ТТ-носителей в экзоне 8 являются также СС-носителями в интроне 6).

Таблица 5			
	Инtron 6 ТТ	Инtron 6 ТС	Инtron 6 СС
Экзон 8 СС	197 (64%)	59 (19%)	3 (1%)
Экзон 8 СТ	2 (1%)	30 (10%)	11 (4%)
Экзон 8 ТТ	0 (0%)	0 (0%)	6 (2%)

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

	atg aat gcc aac cct tct cct cca cca agt cct tct cag caa atc aac	294
	Met Asn Ala Asn Pro Ser Pro Pro Pro Ser Pro Ser Gln Gln Ile Asn	
	70 75 80	
5	ctt ggc ccg tcg tcc aat cct cat gct aaa cca tct gac ttt cac ttc	342
	Leu Gly Pro Ser Ser Asn Pro His Ala Lys Pro Ser Asp Phe His Phe	
	85 90 95 100	
	ttg aaa gtg atc gga aag ggc agt ttt gga aag gtt ctt cta gca aga	390
	Leu Lys Val Ile Gly Lys Gly Ser Phe Gly Lys Val Leu Leu Ala Arg	
10	105 110 115	
	cac aag gca gaa gaa gtg ttc tat gca gtc aaa gtt tta cag aag aaa	438
	His Lys Ala Glu Glu Val Phe Tyr Ala Val Lys Val Leu Gln Lys Lys	
	120 125 130	
15	gca atc ctg aaa aag aaa gag gag aag cat att atg tcg gag cgg aat	486
	Ala Ile Leu Lys Lys Lys Glu Glu Lys His Ile Met Ser Glu Arg Asn	
	135 140 145	
	gtt ctg ttg aag aat gtg aag cac cct ttc ctg gtg ggc ctt cac ttc	534
	Val Leu Leu Lys Asn Val Lys His Pro Phe Leu Val Gly Leu His Phe	
20	150 155 160	
	tct ttc cag act gct gac aaa ttg tac ttt gtc cta gac tac att aat	582
	Ser Phe Gln Thr Ala Asp Lys Leu Tyr Phe Val Leu Asp Tyr Ile Asn	
	165 170 175 180	
25	ggg gga gag ttg ttc tac cat ctc cag agg gaa cgc tgc ttc ctg gaa	630
	Gly Gly Glu Leu Phe Tyr His Leu Gln Arg Glu Arg Cys Phe Leu Glu	
	185 190 195	
	cca cgg gct cgt ttc tat gct gct gaa ata gcc agt gcc ttg ggc tac	678
	Pro Arg Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Glu Ile Ala Ser Ala Leu Gly Tyr	
30	200 205 210	
	ctg cat tca ctg aac atc gtt tat aga gac tta aaa cca gag aat att	726
	Leu His Ser Leu Asn Ile Val Tyr Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Ile	
	215 220 225	
35	ttg cta gat tca cag gga cac att gtc ctt act gac ttc gga ctc tgc	774
	Leu Leu Asp Ser Gln Gly His Ile Val Leu Thr Asp Phe Gly Leu Cys	
	230 235 240	
	aag gag aac att gaa cac aac agc aca aca tcc acc ttc tgt ggc acg	822
	Lys Glu Asn Ile Glu His Asn Ser Thr Thr Ser Thr Phe Cys Gly Thr	
40	245 250 255 260	
	ccg gag tat ctc gca cct gag gtg ctt cat aag cag cct tat gac agg	870
	Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu His Lys Gln Pro Tyr Asp Arg	
	265 270 275	
45	act gtg gac tgg tgg tgc ctg gga gct gtc ttg tat gag atg ctg tat	918
	Thr Val Asp Trp Trp Cys Leu Gly Ala Val Leu Tyr Glu Met Leu Tyr	
	280 285 290	
	ggc ctg ccg cct ttt tat agc cga aac aca gct gaa atg tac gac aac	966
	Gly Leu Pro Pro Phe Tyr Ser Arg Asn Thr Ala Glu Met Tyr Asp Asn	
50	295 300 305	

RU 2 287 160 C2

att ctg aac aag cct ctc cag ctg aaa cca aat att aca aat tcc gca 1014
 Ile Leu Asn Lys Pro Leu Gln Leu Lys Pro Asn Ile Thr Asn Ser Ala
 310 315 320

5 aga cac ctg ctg gag ggc ctc ctg cag aag gac agg aca aag cgg ctc 1062
 Arg His Leu Leu Glu Gly Leu Leu Gln Lys Asp Arg Thr Lys Arg Leu
 325 330 335 340

ggg gcc aag gat gac ttc atg gag att aag agt cat gtc ttc ttc tcc 1110
 Gly Ala Lys Asp Asp Phe Met Glu Ile Lys Ser His Val Phe Phe Ser
 345 350 355

10 tta att aac tgg gat gat ctc att aat aag aag att act ccc cct ttt 1158
 Leu Ile Asn Trp Asp Asp Leu Ile Asn Lys Lys Ile Thr Pro Pro Phe
 360 365 370

15 aac cca aat gtg agt ggg ccc aac gac cta cgg cac ttt gac ccc gag 1206
 Asn Pro Asn Val Ser Gly Pro Asn Asp Leu Arg His Phe Asp Pro Glu
 375 380 385

ttt acc gaa gag cct gtc ccc aac tcc att ggc aag tcc cct gac agc 1254
 Phe Thr Glu Glu Pro Val Pro Asn Ser Ile Gly Lys Ser Pro Asp Ser
 390 395 400

20 gtc ctc gtc aca gcc agc gtc aag gaa gct gcc gag gct ttc cta ggc 1302
 Val Leu Val Thr Ala Ser Val Lys Glu Ala Ala Glu Ala Phe Leu Gly
 405 410 415 420

25 ttt tcc tat gcg cct ccc acg gac tct ttc ctc tgaaccctgt tagggcttgg 1355
 Phe Ser Tyr Ala Pro Thr Asp Ser Phe Leu
 425 430

ttttaaagga ttttatgtgt gtttccgaat gttttagtta gccttttggt ggagccgcca 1415

30 gctgacagga catcttaca gagaaatttgc acatctctgg aagcttagca atcttattgc 1475

acactgttcg ctggaagctt tttgaagagc acattctcct cagtgagctc atgaggtttt 1535

catttttatt cttccttcca acgtggtgct atctctgaaa cgagcgtag agtgccgcct 1595

35 tagacggagg caggagtttc gttagaaagc ggacgctggt ctaaaaaagg tctcctgcag 1655

atctgtctgg gctgtgatga cgaatattat gaaatgtgcc ttttctgaag agattgtggt 1715

agctccaaag cttttcctat cgcagtggtt cagttcttta ttttcccttg tggatatgct 1775

40 gtgtgaaccg tcgtgtgagt gtggtatgcc tgatcacaga tggattttgt tataagcatc 1835

aatgtgacac ttgcaggaca ctacaacgtg ggacattggt tgtttcttcc atatttgga 1895

gataaattta tgtgtagact tttttgtaag atacggttaa taactaaaat ttattgaaat 1955

45 ggtcttgcaa tgactcgtat tcagatgctt aaagaaagca ttgctgctac aaatatttct 2015

atttttagaa agggttttta tggaccaatg cccagttgt cagtcagagc cgttggtggt 2075

tttcattggt taaaatgtca cctgtaaaat gggcattatt tatgtttttt tttttgcatt 2135

50 cctgataatt gtatgtattg tataaagaac gtctgtacat tgggttataa cactagtata 2195

tttaaactta caggcttatt tgtaatgtaa accaccattt taatgtactg taattaacat 2255

ggttataata cgtacaatcc ttccctcatc ccatcacaca acttttttttg tgtgtgataa 2315

actgatttttg gtttgcaata aaaccttgaa aaatatttta 2354

<210> 2

<211> 431

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Thr Val Lys Thr Glu Ala Ala Lys Gly Thr Leu Thr Tyr Ser Arg
1 5 10 15

15 Met Arg Gly Met Val Ala Ile Leu Ile Ala Phe Met Lys Gln Arg Arg
20 25 30

Met Gly Leu Asn Asp Phe Ile Gln Lys Ile Ala Asn Asn Ser Tyr Ala
35 40 45

20 Cys Lys His Pro Glu Val Gln Ser Ile Leu Lys Ile Ser Gln Pro Gln
50 55 60

Glu Pro Glu Leu Met Asn Ala Asn Pro Ser Pro Pro Ser Pro Ser
65 70 75 80

25 Gln Gln Ile Asn Leu Gly Pro Ser Ser Asn Pro His Ala Lys Pro Ser
85 90 95

Asp Phe His Phe Leu Lys Val Ile Gly Lys Gly Ser Phe Gly Lys Val
100 105 110

30 Leu Leu Ala Arg His Lys Ala Glu Glu Val Phe Tyr Ala Val Lys Val
115 120 125

Leu Gln Lys Lys Ala Ile Leu Lys Lys Lys Glu Glu Lys His Ile Met
130 135 140

35 Ser Glu Arg Asn Val Leu Leu Lys Asn Val Lys His Pro Phe Leu Val
145 150 155 160

Gly Leu His Phe Ser Phe Gln Thr Ala Asp Lys Leu Tyr Phe Val Leu
165 170 175

40 Asp Tyr Ile Asn Gly Gly Glu Leu Phe Tyr His Leu Gln Arg Glu Arg
180 185 190

Cys Phe Leu Glu Pro Arg Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Glu Ile Ala Ser
195 200 205

45 Ala Leu Gly Tyr Leu His Ser Leu Asn Ile Val Tyr Arg Asp Leu Lys
210 215 220

Pro Glu Asn Ile Leu Leu Asp Ser Gln Gly His Ile Val Leu Thr Asp
225 230 235 240

50

Phe Gly Leu Cys Lys Glu Asn Ile Glu His Asn Ser Thr Thr Ser Thr
 245 250 255

Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu His Lys Gln
 260 265 270

5 Pro Tyr Asp Arg Thr Val Asp Trp Trp Cys Leu Gly Ala Val Leu Tyr
 275 280 285

Glu Met Leu Tyr Gly Leu Pro Pro Phe Tyr Ser Arg Asn Thr Ala Glu
 290 295 300

10 Met Tyr Asp Asn Ile Leu Asn Lys Pro Leu Gln Leu Lys Pro Asn Ile
 305 310 315 320

Thr Asn Ser Ala Arg His Leu Leu Glu Gly Leu Leu Gln Lys Asp Arg
 325 330 335

15 Thr Lys Arg Leu Gly Ala Lys Asp Asp Phe Met Glu Ile Lys Ser His
 340 345 350

Val Phe Phe Ser Leu Ile Asn Trp Asp Asp Leu Ile Asn Lys Lys Ile
 355 360 365

20 Thr Pro Pro Phe Asn Pro Asn Val Ser Gly Pro Asn Asp Leu Arg His
 370 375 380

Phe Asp Pro Glu Phe Thr Glu Glu Pro Val Pro Asn Ser Ile Gly Lys
 385 390 395 400

25 Ser Pro Asp Ser Val Leu Val Thr Ala Ser Val Lys Glu Ala Ala Glu
 405 410 415

Ala Phe Leu Gly Phe Ser Tyr Ala Pro Pro Thr Asp Ser Phe Leu
 420 425 430

30

Формула изобретения

1. Способ диагностики in vitro, обусловленной генетическими факторами предрасположенности к гипертонии, отличающийся тем, что в выделенном из организма пациента образце выявляют:

35 (а) коррелирующий с гипертонией SNP, который выявляется в экзоне 8 (C→T) гена hsgk1 и представлен в SEQ ID NO:1;

(б) коррелирующий с гипертонией SNP, который выявляется в интроне 6 (T→C) гена hsgk1 и локализован в фрагменте размером 551 п.о. против хода транскрипции по отношению к SNP в экзоне 8 согласно подпункту (а), или

40 (в) коррелирующий с гипертонией подпункту (а) и коррелирующий с гипертонией SNP подпункту (б).

2. Применение коррелирующего с гипертонией SNP, который выявляется в экзоне 8 (C→T) гена hsgk1 и представлен в SEQ ID NO:1, коррелирующего с гипертонией SNP, который выявляется в интроне 6 (T→C) гена hsgk1 и локализован во фрагменте размером 551 п.о. против хода транскрипции по отношению к SNP в экзоне 8 согласно подпункту (а) или обоих типов SNP для получения диагностикомов, предназначенных для диагностики обусловленной генетическими факторами предрасположенности к гипертонии.

3. Набор для диагностики обусловленной генетическими факторами предрасположенности к гипертонии, содержащий полинуклеотид для выявления специфического типа SNP в гене hsgk1, в частности содержащего специфическую область гена hsgk1, включающую коррелирующий с гипертонией SNP, который выявляется в экзоне 8 (C→T) гена hsgk1 и представлен в SEQ ID NO:1, коррелирующий с гипертонией SNP,

который выявляется в интроне 6(T→C) гена hsgk1 и локализован во фрагменте размером 551 п.о. против хода транскрипции по отношению к SNP в экзоне 8 согласно подпункту (а), или оба типа SNP.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

1	ENSE00000798789	AL135839.15.1.113673	-1	27517	27634	118 пар оснований
GGTCTTTGAGCGCTAACGTCTTTCTGTCTCCCCGCGGTGGTGTGACGGT GAAAACGTAGGCTGCTAAGGGCACCCCTCACTTACTCCAGGATGAGGGGCA TGGTGGCAATTTCTCATCG						
2	ENSE00000798790	AL135839.15.1.113673	-1	27296	27371	76 пар оснований
CTTTTCATGAAGCAGAGGAGGATGGGTCTGAACGACTTTATTTCAGAAGATT GCCAATAACTTCCTATGCATGCAAACA						
3	ENSE00000798791	AL135839.15.1.113673	-1	26790	26865	76 пар оснований
CCCTGAAGTTTCAGTCCATCTTGAAGATCTCCAACCTCAGGAGCCTGAGC TTATGAATGCCAACCCCTTCTCCTCCA						
4	ENSE00000798792	AL135839.15.1.113673	-1	26247	26351	105 пар оснований
CCAAGTCCCTTCTCAGCAAATCAACCTTGGCCCGTCTCCAATCCTCATGC TAAACCATCTGACTTTCACTTCTTGAAGTGATCGGAAAGGGCAGTTTTG GAAAG						
5	ENSE00000798793	AL135839.15.1.113673	-1	26059	26142	84 пары оснований
GTTCTTCTAGCAAGACACAAGGCAGAAGAAGTGTTCATGCAAGTCAAAGT TTTACAGAAGAAAGCAATCCTGAAAAAGAAAGAG						
6	ENSE00000798794	AL135839.15.1.113673	-1	25808	25939	132 пары оснований
GAGAAGCATATTATGTCCGAGCGGAATGTCTGTGGAAGAATGTGAAGCA CCCTTTCCTGGTGGGCCCTCACTTCTCTTCCAGACTGCTGACAAATTGT ACTTTGTCTTAGACTACATTAATGGTGGAGAG						
7	ENSE00000798795	AL135839.15.1.113673	-1	25447	25559	113 пар оснований
TTGTTCTACCATCTCCAGAGGGAACGCTGCTTCTGGAACACGGGCTCG TTTCTATGCTGCTGAAATAGCCAGTGCCTTGGGCTACCTGCATTCACTGA ACATCGTTTATAG						
8	ENSE00000798796	AL135839.15.1.113673	-1	24978	25101	124 пары оснований
AGACTTAAAACCAGAGAATATTTTGTAGATTACAGGGACACATTTCTCCTT <u>ACTGA</u> <u>TTCCGACTCTGCAAGGAGAACAT</u> <u>TGAAACACAACAGCACAAACA</u> TCCACCTTCTGTGGCACGCCGGAG						
9	ENSE00000798797	AL135839.15.1.113673	-1	24422	24517	96 пар оснований
TATCTCGACCTGAGGTGCTTCATAAGCAGCCTTATGACAGGACTGTGGA CTGGTGGTGCCTGGGAGCTGTCTTGTATGAGATGCTGTATGGCCTG						
10	ENSE00000798798	AL135839.15.1.113673	-1	23808	23963	156 пар оснований
CCGCCTTTTATAGCCGAAACACAGCTGAAATGTACGACAACATTCTGAA CAAGCCTCTCCAGCTGAAACCAAATATTACAAATTCGGCAAGACACCTCC TGGAGGGCCTCCTGCAGAAGGACAGGACAAAGCGGCTCGGGGCCAAGGAT GACTTC						
11	ENSE00000798799	AL135839.15.1.113673	-1	23611	23700	90 пар оснований
ATGGAGATTAAGAGTCATGTCTTCTTCTCCTTAATTAACCTGGGATGATCT CATTAATAAGAAGATTACTCCCCCTTTTAAACCAAATGTG						
12	ENSE00000798800	AL135839.15.1.113673	-1	22037	23220	1184 пары оснований
AGTGGGCCCCAACGACCTACGGCACTTTGACCCCGAGTTTACCGAAGAGCC TGTCCCCAACCTCATTGGCAAGTCCCCTGACAGCGTCTCGTACAGCCA GCGTCAAGGAAGCTGCCGAGGCTTTTCTAGGCTTTTCTATGCGCCTCCC ACGGACTCTTCTCTGAACCCCTGTTAGGGCTTGGTTTTAAAGGATTTTA TGTGTGTTTTCCGAATGTTTTAGTTAGCCTTTTGGTGGAGCCGCCAGCTGA CAGGACATCTTACAAGAGAATTTGCACATCTCTGGAAGCTTAGCAATCTT ATTGCACACTGTTGCTGGAAGCTTTTTGAAGAGCACATCTCCTCAGTG AGCTCATGAGGTTTTTATTCTTCTTCCACGTTGGTGTATCTC TGAACGAGCGTTAGAGTGCCGCTTAGACGGAGGCAGGAGTTTCGTTAG AAAGCGGACGCTGTTCTAAAAAAGGTCTCCTGCAGATCTGTCTGGGCTGT GATGACGAATATTATGAAATGTGCCTTTTCTGAAGAGATTGTGTTAGCTC CAAAGCTTTTCTATCGCAGTGTTCAGTCTTTATTTTCCCTTGTGGAT ATGCTGTGTGAACCGTCTGTGAGTGTGGTATGCCTGATCACAGATGGAT TTTGTATAAGCATCAATGTGACACTTGCAGGACACTACAACGTGGGACA TTGTTTGTTCCTCCATATTTGGAAGATAAATTTATGTGTAGACTTTTTT GTAAGATACGGTTAATAACTAAAAATTTATTGAAATGGTCTTGCAATGACT CGTATTTCAGATGCTTAAAGAAAGCATTGCTGCTACAAATATTTCTATTTT TAGAAAGGGTTTTTATGGACCAATGCCCCAGTTGTGAGTACAGCCGTTG GTGTTTTTCATTGTTTAAAATGTCACCTGTAATAATGGGCATTATTTATGT TTTTTTTTTGCATTCTGATAATGTATGTATTGTATAAAGAACGCTCTG TACATTTGGTTATAACACTAGTATATTTAACTTACAGGCTTATTTGTAA TGTAACCACCATTTTAAATGTACTGTAATTAACATGGTTATAAATACGTAC AATCCTTCCCTCATCCCATCACACAACCTTTTTTTGTGTGTGATAAAGTGA TTTTGGTTTGCATAAAACCTTAAAAATATTTA						