

А.В. Степанова<sup>1</sup>, К.Ю. Кулебякин<sup>1\*</sup>, Т.Н. Кочегура<sup>1</sup>, М.В. Шестакова<sup>2</sup>, В.А. Ткачук<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии, Москва, Российская Федерация

## Однонуклеотидные полиморфизмы в генетике сахарного диабета 2-го типа: подходы к их идентификации

В развитии сахарного диабета 2-го типа (СД2) важную роль играет комбинация факторов окружающей среды (гиподинамия, избыточное питание и т.д.) и генетических вариантов, обуславливающих предрасположенность к развитию заболевания. Вклад наследуемых признаков в развитие СД2 может достигать 80%, что подтверждается результатами целого ряда опубликованных исследований. В то же время мультифакторность и полигенность природы СД2 затрудняют установление прямых причинно-следственных связей между отдельными генетическими вариантами и конкретными метаболическими изменениями. Этим объясняются большое количество исследований и длительные поиски наиболее удобных и эффективных подходов к оценке роли одиночных нуклеотидных полиморфизмов (SNP), являющихся основным типом генетических вариаций в геноме человека. Привлечение специалистов из различных областей знаний и появление множества способов для обработки и интерпретации данных обусловили параллельное развитие различных научных подходов. В настоящем обзоре будут освещены основные из них (кроме математических), представлена характеристика этих подходов и дана оценка полученных с их помощью результатов. Особое внимание уделено новым возможностям и разработкам в рамках использования современных методов редактирования генома, в частности системы CRISPR/Cas9, и перспективам этого направления.

**Ключевые слова:** однонуклеотидные полиморфизмы, SNP, сахарный диабет, редактирование генома, CRISPR/Cas9.

(Для цитирования: Степанова А.В., Кулебякин К.Ю., Кочегура Т.Н., Шестакова М.В., Ткачук В.А. Однонуклеотидные полиморфизмы в генетике сахарного диабета 2-го типа: подходы к их идентификации. Вестник РАМН. 2019;74(1):44–53. doi: 10.15690/vramn1037)

44

### Актуальность

Несмотря на значительный прогресс в понимании механизмов развития сахарного диабета 2-го типа (СД2), роль генетических факторов при данном заболевании по-прежнему до конца не выяснена.

Трудности установления прямых причинно-следственных связей между отдельными генетическими вариантами и конкретными метаболическими изменениями при СД2 связаны с полигенным характером заболевания. Существенное влияние на реализацию функций множества вовлеченных генов и тесное взаимодействие между ними оказывают внешние воздействия. К основным ха-

рактеристикам генетики СД2 относятся неустойчивая пенетрантность (от 10 до 40%) и высокая частота аллелей со слабым или средним эффектом предрасположенности к заболеванию (отношение шансов от 1,1 до 1,5) [1].

Наиболее распространенным типом генетической вариации у человека являются одиночные нуклеотидные полиморфизмы (single nucleotide polymorphism, SNP), которые возникают вследствие точечных мутаций. SNP представляют собой различия в одной паре нуклеотидов (замена) в последовательности ДНК, встречающиеся более чем у 1% в общей популяции. У человека в среднем такие замены наблюдаются в 1 из каждых 500–1000 нуклеотидов [2, 3], обычно в межгенных областях [4]. Как

A.V. Stepanova<sup>1</sup>, K.Y. Kulebyakin<sup>1</sup>, T.N. Kochegura<sup>1</sup>, M.V. Shestakova<sup>2</sup>, V.A. Tkachuk<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Endocrinology Research Centre, Moscow, Russian Federation

## Genetic Variants Associated with the Development of Type 2 Diabetes: Approaches to Their Identification

In the development of type 2 diabetes (T2D), an important role is played by a combination of environmental factors (hypodynamia, hypernutrition, etc.) and genetic variants that predispose the development of the disease. The contribution of inherited traits to the development of T2D can reach 80%, which is confirmed by the results of a number of published studies. At the same time, the multifactorial and polygenetic nature of T2D makes it difficult to establish direct cause-effect relations between individual genetic variants and specific metabolic changes. This explains a large number of studies and a long ongoing search for the most convenient and effective strategy for assessing the role of single nucleotide polymorphisms (SNP), the main type of genetic variation in the human genome. Involvement of specialists from various fields and the emergence of many methods for processing and interpreting data have led to the parallel development of scientific approaches. In this review of the main approaches (except mathematical ones) their characteristics will be described and the results obtained with their help will be evaluated, with special focus on new features of modern methods of genome editing, in particular the CRISPR/Cas9 system, and the future prospects in this area.

**Key words:** single nucleotide polymorphism; diabetes mellitus; gene editing; CRISPR/Cas9.

(For citation: Stepanova AV, Kulebyakin KY, Kochegura TN, Shestakova MV, Tkachuk VA. Genetic Variants Associated with the Development of Type 2 Diabetes: Approaches to Their Identification. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2019;74(1):44–53. doi: 10.15690/vramn1037)

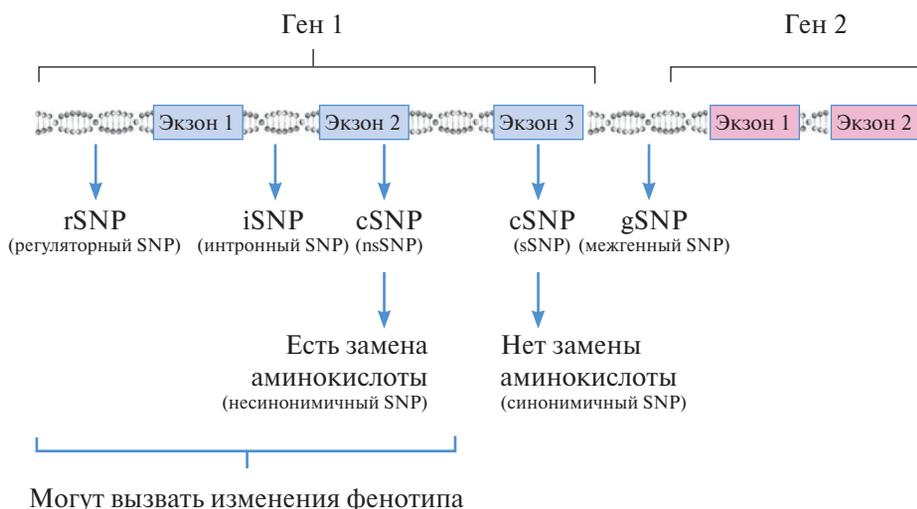


Рис. 1. Классификация SNP

правило, SNP классифицируют по их расположению в геноме (полиморфизмы в кодирующих областях генома, в промоторных участках и пр.) и влиянию на последовательность белка, кодируемого измененным геном (синонимичные и несинанимичные) [5] (рис. 1).

SNP могут влиять на предрасположенность к различным заболеваниям, скорость и тяжесть развития осложнений [6, 7], а также чувствительность к лекарственным препаратам [8, 9], что было показано во многих работах, в том числе изучающих СД2, по данным которых его наследуемость в некоторых семьях достигает 80% [10]. На современном этапе в арсенале исследователей имеются 4 основных подхода-стратегии к изучению роли SNP в патогенезе СД2, а именно:

- изучение редких семейных форм [11–14];
- исследование генов-кандидатов и анализ групп сцепления в популяционных исследованиях типа «случай–контроль» с последующим метаанализом [15–18];
- полногеномные ассоциативные исследования (genome-wide association studies, GWAS) и различные математические подходы для интерпретации полученных данных [19–21];
- редактирование генома в клеточных и мышинных моделях [22–24].

В настоящем обзоре будет представлена характеристика этих подходов и дана оценка полученных с их помощью результатов. Поиск литературы проводился в англоязычных базах данных PubMed и Science Direct с использованием таких ключевых слов, как «snp», и/или «single nucleotide polymorphism», и/или «gene editing», и/или «Crispr/Cas9», и/или «GWAS», и/или «animal model», и/или «gene candidate» и «diabetes mellitus» и/или «insulin resistance/sensitivity»; выбранным временным периодом публикации были 2010–2018 гг. Особое внимание в данном обзоре уделено новым возможностям и разработкам в рамках использования современных методов редактирования генома, в частности системы CRISPR/Cas9, и перспективам этого направления.

### Редкие семейные формы сахарного диабета: начало поиска и установление роли SNP в генетике СД2

Помимо СД2 существуют также другие виды нарушений углеводного обмена со схожими симптомами,

но гораздо более изученными патофизиологическими механизмами [25]. К таким заболеваниям относятся и сахарный диабет 1-го типа, в основе которого лежит аутоиммунное разрушение  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, и многие другие более редкие формы, имеющие значительное клиническое сходство с СД2, включая сахарный диабет молодых (maturity onset diabetes of the young, MODY) [13], неонатальный сахарный диабет (neonatal diabetes mellitus, NDM) [12, 13], некоторые мультиорганные синдромы, такие как Донахью, Рабсона–Менденхолла, Вольфрама, митохондриальный СД и др. [14].

Для многих из этих заболеваний были найдены конкретные каузальные мутации внутри одного гена (их относят к группе моногенного сахарного диабета), что позволило разработать эффективные методы их диагностики и лечения [13]. Для них характерно менделевское наследование с большой пенетрантностью причинных аллелей и минимальным вкладом окружающей среды [26].

В процессе исследования заболеваний с нарушением метаболизма глюкозы, с единой и четко определенной молекулярной причиной возможно отследить связь между дефектными генами, биохимической или регуляторной дисфункцией и клиническим фенотипом. Эти формы можно рассматривать как упрощенные и частичные модели СД2, поскольку они не могут воспроизвести всю сложность его патогенеза, но позволяют обнаружить определенные пути и гены, имеющие принципиальное значение и для общей популяции. Так, известным примером моногенного сахарного диабета является дефект генов субъединиц АТФ-чувствительных калиевых каналов, которые участвуют в процессе экзоцитоза инсулина из клеток островков Лангерганса [27]. АТФ-чувствительный калиевый канал состоит из двух субъединиц — канала Kir6.2, кодируемого геном *KCNJ11*, и регуляторной субъединицы SUR1, кодируемой геном *ABCC8*. В любом из этих генов могут появиться мутации, ведущие к сохранению канала в открытой конформации, что обуславливает диабетический фенотип (чаще всего NDM, реже к MODY). Значение однонуклеотидных полиморфизмов в генах *KCNJ11* и *ABCC8* было достоверно подтверждено и для общей популяции СД2 (табл. 1) [13, 28, 29].

Помимо этого, принципиально важным достижением при изучении моногенных форм, а именно семейств MODY, стало открытие мутаций в ключевых генах панкреатических транскрипционных факторов (*HNF1a*, *HNF1b*, *HNF4a*, *PDX1*, *NeuroD1*) и последовательностях,

**Таблица 1.** SNP, обнаруженные с помощью метода исследования генов-кандидатов, имеющих клиническое значение

Ген	SNP	Возможный эффект	ОШ*	Моногенный фенотип	Источник
PPARG	Pro12Ala	Влияет на связывание с целевой последовательностью ДНК; аллель (Pro) связана с более высоким ИМТ, ИР и повышенным риском СД	1,16	Семейная парциальная липодистрофия	[30, 31]
KCNJ11	Glu23Lys	Уменьшение секреции инсулина	1,08	NDM, MODY	[32, 33]
IRS-1	rs2943640	ИР	1,09	MODY, NDM	[32, 33]
WFS-1 (вольфрамин)	rs4458523	Участвует в функции β-клеток	1,09	Синдром Вольфрама (несахарный диабет, ювенильный диабет, атрофия зрительного нерва и глухота)	[34, 35]
HNF1A HNF1B HNF4A	rs12427353 rs4430796 rs4812829	Функция β-клеток	1,12 1,13 1,07	MODY	[32, 35]

*Примечание.* \* — показатели отношения шансов (ОШ) по данным последующих GWAS. ИМТ — индекс массы тела, ИР — инсулинорезистентность, СД — сахарный диабет.

с которыми они связываются. Это сыграло важную роль в определении каскадов факторов транскрипции, участвующих в нормальной β-клеточной функции и, кроме того, позволило установить значение фермента глюкокиназы в качестве β-клеточного датчика глюкозы при нарушениях углеводного обмена [36].

В отличие от отдельных вариаций в генах секреции инсулина и транскрипционных факторов β-клеток моногенные дефекты, приводящие к инсулинорезистентности — второму фундаментальному компоненту фенотипа СД2, изучены недостаточно. Тем не менее описаны различные мутации гена инсулинового рецептора (*INSR*), которые связаны с синдромами резистентности к инсулину различной степени: например, синдромы Донахью, Рабсона–Менденхолла; резистентность к инсулину типа А. При этом их клиническая картина, как правило, тяжелая и включает не только нарушение метаболизма глюкозы, но и серьезные последствия гиперинсулиемии, которые могут развиваться и у некоторых больных СД2, такие как черный акантоз (*acanthosis nigricans*), гирсутизм и синдром поликистозных яичников [14].

Определенные мутации в гене *AKT2*, кодирующем протеинкиназу В, которая играет центральную роль в пост-рецепторной передаче инсулинового сигнала, приводят к развитию клинической картины инсулинорезистентности и гипертриглицеридемии натошак, низкому уровню липопротеидов высокой плотности и высокому — липопротеидов низкой плотности (нарушения, похожие на дислипидемию, сопровождающую СД2). Помимо этого, пациенты имеют стеатоз печени, напоминающий безалкогольную жировую болезнь печени при СД2 [27].

Инсулинорезистентность также часто сопряжена с энергетическим дисбалансом и ожирением и может быть частью метаболического синдрома. Таким образом, ожидаемо, что мутации в генах транскрипционных фак-

торов, регулирующих клеточный метаболизм, ассоциированы с СД2. И действительно, были описаны семьи с мутациями с потерей функции в лигандсвязывающем домене адипоцитарного мастер-регулятора PPARγ (P476L и V290M), в которых развивались СД с выраженной инсулинорезистентностью, дислипидемия и ранняя артериальная гипертензия [36].

Важно отметить, что после того, как в 1990-х годах был описан первый набор генов, связанных с развитием моногенных форм сахарного диабета, были выдвинуты предположения о возможной роли других генетических вариантов с меньшими эффектами, но в этих же генах и для СД2 [15, 37] (табл. 2). Такие SNP могут влиять на экспрессию или функцию генов, но, поскольку степень их влияния достаточно низкая, они не приводят к развитию болезни, однако являются достаточными для изменения риска возникновения полигенного заболевания. Данная гипотеза была проверена с помощью исследований ассоциации для генов-кандидатов и анализа групп сцепления [11–30, 32, 36–46].

### Анализ групп сцепления и анализ ассоциации генов-кандидатов в популяционных исследованиях типа «случай–контроль»

Анализ групп сцепления и анализ ассоциации длительное время были основным подходом к поиску SNP (картированию генов) и установлению их связи с полигенными заболеваниями человека [37]. Они основаны на биологическом феномене сцепленного наследования генов.

#### Анализ групп сцепления

При анализе групп сцепления (*linkage studies*) генетический локус, связанный с заболеванием, определяется

**Таблица 2.** SNP, обнаруженные с помощью метода анализа групп сцепления

Ген	Белок	Функция	SNP	Эффекты у носителей аллелей риска	Источник
CAPN10	Цистеиновая протеаза из семейства кальпаинов	Облегчает транслокацию GLUT4, участвует в реорганизации цитоскелета	rs3792267 rs3842570 rs5030952	Снижение чувствительности к инсулину	[38]
TCF7L2	Фактор транскрипции 7, подобный фактору 2	Участник сигнального пути Wnt, активен в β-клетках	rs7903146	Снижение секреции инсулина и чувствительности к глюкагоноподобному пептиду 1 (GLP-1, инкретин)	[20]

при помощи поиска блока полиморфных генетических маркеров в разных хромосомах (или микросателлита, где последовательность нескольких пар оснований повторяется переменное количество раз, или SNP). Определяющим для данного метода является одинаковое расположение такого блока маркеров у людей с заболеванием, при этом вариант аллели может различаться. Как правило, исследуются генетические особенности одной семьи или расширенных родословных [40].

Существенным недостатком анализа групп сцепления является относительно низкое разрешение, так как по всему геному обычно генотипируются только несколько сотен маркеров, а области, идентифицированные посредством сцепления, могут включать миллионы базовых пар и сотни генов. Также важное значение имеет высокая пенетрантность аллели, связанной с развитием заболевания [40].

Важно отметить, что этот метод был довольно успешен в обнаружении редких вариантов СД: например, он способствовал открытию генов, лежащих в основе различных типов MODY и NDM [9, 10]. Однако анализ групп сцепления оказался относительно неудачным в идентификации генов, участвующих в сложных полиетиологических нарушениях, в которых фенотип возникает как комбинация нескольких генетических вариантов и их взаимодействия с окружающей средой. Анализ групп сцепления не давал воспроизводимых положительных результатов для многих генов и в случае СД2, но с помощью него был обнаружен ряд локусов, подтвердивших свое значение в других исследованиях, в частности для генов кальпаина 10 (*CAPN10*) и транскрипционного фактора 7, подобного фактору 2 (*TCF7L2*) (см. табл. 2).

#### Анализ ассоциации генов-кандидатов

Исследования ассоциаций для генов-кандидатов в группах «случай–контроль» длительное время были основным подходом к изучению генетических ассоциаций [15, 37]. С их помощью идентифицировали многие аллели риска, связанные с конкретным заболеванием. В настоящее время проведение таких исследований характеризуется низкой стоимостью и быстротой выполнения в связи с усовершенствованием молекулярных технологий обнаружения (от целенаправленного секвенирования целевых областей к множественному генотипированию на чипах) [16].

В случае анализа ассоциации, в отличие от анализа групп сцепления, оцениваются генотипы независимых групп больных и здоровых, а не семейные родословные. В основе такого подхода лежит тезис об одинаковом варианте маркерного аллеля (SNP) у большинства больных ввиду его общего эволюционного происхождения [15]. При этом, как правило, исследования анализа ассоциации сосредоточены на генах, для которых ранее в других работах уже была показана некоторая связь с заболеванием и получены предварительные данные о функции генов. Так, самые первые исследования SNP для СД2 были нацелены на последовательности генов, участвующих в метаболизме глюкозы, секреции инсулина, инсулиновых рецепторах, пострецепторной сигнализации и липидного обмена. Эта стратегия привела к открытию первых причинных генов для моногенных форм сахарного диабета, таких как гены инсулинового рецептора и глюкокиназы [14].

После выбора предполагаемого гена-кандидата следуют оценка и выбор полиморфизмов (на данный момент

это можно сделать с помощью баз данных, например OMIM, PubMed, ChroMoS, fcGENE), обычно тех, для которых ожидаются функциональные последствия (влияние на регуляцию гена или экспрессируемый с него белок). Затем проверяется связь вариантов выбранного гена (SNP) с одним из признаков (заболевания) путем сравнения показателей у лиц с заболеванием («случаев») и субъектов контроля, после чего оценивается его ассоциация с прогнозом болезни и диагнозом, т.е. будущий потенциал SNP в качестве биомаркера. Эта оценка базируется исключительно на статистических данных (встречаемости предполагаемого фактора риска SNP) и корреляционном анализе. В этом и заключается принципиальное отличие исследований «случай–контроль» от когортных исследований: в результате исследования «случай–контроль» невозможно измерить относительный риск воздействия и определить частоту новых случаев заболеваний в популяции, а можно лишь оценить риск развития заболевания на основании полученного значения отношения шансов (ОШ) [16].

Данный метод предоставляет ценную и клинически значимую в качестве диагностического инструмента и персонализированного подхода информацию, также позволяет определить взаимосвязь некоторых фенотипических признаков с конкретным генотипом. Однако серьезным недостатком является не только ограниченность метода, связанная с опорой на уже имеющиеся данные, но и частая невозможность на больших популяциях, что обычно объясняется систематическим различием в частоте аллелей между субпопуляциями, возможно, из-за несхожих родословных (population stratification) [17]. В частности, для большинства генов, участвующих в секреции и действии инсулина, не подтверждена достоверная связь с СД2 в больших популяциях, поэтому успехи данного подхода в понимании полигенной природы СД можно назвать скромными. Тем не менее некоторые клинически значимые полиморфизмы все-таки были идентифицированы, например, такие как варианты Pro12Ala гена *PPARG* [18] и Glu23Lys гена *KCNJ11* [28], генов субстрата рецептора инсулина 1 (*IRS1*) и 2 (*IRS2*), вольфрамина (*WFS1*), транскрипционных факторов *HNF1A*, *HNF1B* и *HNF4A* (см. табл. 1), связанные с риском развития СД2.

Кроме того, при оценке данного метода важно учесть проблему множественных сравнений из-за учета одного и того же SNP в различных тестах, что может привести к ложным показателям обнаружения. Последнее обычно решается статистическими поправками. К другим причинам ложноположительных результатов можно отнести системные ошибки генотипирования и низкие статистические мощности. Стоит признать, что в настоящее время существует множество способов избежать все вышеописанные недостатки [16, 17]. И тем не менее остается до конца неясным, отражают ли полученные результаты определенную причинно-следственную связь генетической вариации и восприимчивости к заболеванию, или же они просто представляют собой определенные наследственные различия, существующие случайно между группами «случай–контроль».

Изучение генов-кандидатов и анализ сцепления выявили несколько генов риска СД2, но их общий вклад в наблюдаемую наследуемость остается небольшим вследствие значительного числа невозможных и неподтвержденных результатов. Тем не менее эти исследования заложили основу для последующего метаанализа боль-

шего количества накопленных данных статистических корреляций, что дает значимую информацию о распространённости генотипов в различных популяциях и особенностях эффекта SNP в них [37].

### Полногеномные ассоциативные исследования

С возникновением новых возможностей исследования генома (сканирование генома с использованием ДНК-биочипов для оценки от 300 тыс. до 2 млн SNP) произошла революция в поиске общераспространённых генетических вариантов, которые могут быть связаны с предрасположенностью к метаболическим заболеваниям [20]. Данный подход, хотя и представляет собой генотипирование индивидуумов, разделённых на группы «случаи» и «контроли» в соответствии с определённым признаком или фенотипом, в отличие от исследований генов-кандидатов и анализа групп сцепления предполагает полное исследование генома и включение различных когорт населения (с помощью формирования крупных международных консорциумов, таких как Genetics of Type 2 Diabetes, GoT2D, и др.) [25].

Важно отметить, что организация крупномасштабных исследований происходила на основе большого массива данных по генотипированию различных популяций, а также информации о распространённых однонуклеотидных полиморфизмах, т.е. с учетом результатов, достигнутых при помощи изложенных выше методов. В частности, одним из результатов самого первого исследования GWAS, проведенного на французской популяции, стало подтверждение значения гена *TCF7L2*, обнаруженного ранее методом анализа групп сцепления одного из основных вносящих вклад в развитие СД2 (SNP rs7903146, ОШ 1,4; для гомозигот — ОШ 2,5 практически во всех популяциях) [25].

В настоящий момент с помощью GWAS и методов секвенирования следующего поколения (полноэкзонное секвенирование [24]) идентифицировано уже более 100 локусов, ассоциированных с СД2 (каталог GWAS (<http://www.ebi.ac.uk/gwas/>), а сотни локусов были идентифицированы как относящиеся к количественным фенотипам, связанным с СД2 (среди них локусы, выявленные при определении количественных гликемических признаков, таких как резистентность к инсулину) [43]. Это позволило не только дополнить понимание о ранее известных механизмах развития заболевания, но также обнаружить новые биологические пути в патогенезе СД2 и выявить новые потенциальные фармакологические мишени [47]. В целом, благодаря GWAS список генетических локусов, связанных с СД2, ожирением и гликемическими нарушениями, за последнее десятилетие был сильно расширен.

Поскольку ожирение является одним из основных факторов развития СД2, гены, повышающие риск ожирения, также проявляются и для СД2 в исследованиях GWAS. Так, в качестве примера можно привести ген, ассоциированный с жировой массой и ожирением (fat mass and obesity-associated protein, *FTO*), и ген рецептора меланокортина 4 (melanocortin 4 receptor, *MC4R*). Для них были обнаружены SNP, ассоциированные с СД2, — rs1164284 (ОШ 1,13), rs12970134 (ОШ 1,08) соответственно. Эти гены, по-видимому, в первую очередь влияют на риск ожирения и, скорее всего, воздействуют на риск СД2 опосредованно (хотя *FTO* может иметь небольшое,

но обнаруживаемое влияние на риск СД2 независимо от риска ожирения) [48].

Примером обнаружения новой фармакологической цели с помощью GWAS может служить белок ZnT8 (ген *SLC30A8*) из семейства транспортеров цинка (ZnTs), которые участвуют в процессе выведения цинка из цитозоля во внеклеточное пространство или внутриклеточные органеллы. Высокие уровни экспрессии транспортера ZnT8 обнаружены в  $\beta$ -клетках островков Лангерганса и пигментном эпителии сетчатки, в значительно меньшей степени определяется мРНК *SLC30A8* в  $\alpha$ -клетках, адипоцитах и лимфоцитах человека [49]. Показано, что зрелый белок находится на пограничной мембране крупных секреторных гранул с плотным ядром. Таким образом, его функция, как предполагается, связана с переносом  $Zn^{2+}$  из цитозоля в гранулы, в  $\beta$ -клетках это требуется для кристаллизации инсулина. В отличие от большинства полиморфизмов, идентифицированных GWAS (они, как правило, не смысловые и находятся в межгенных областях), полиморфизм в гене *SLC30A8* кодирует замещение Trp на Arg в положении 325 (R325W) на С-конце белка, т.е. замена является смысловой и вызывает увеличение риска развития СД2 на 20% на аллель. Поскольку данный белок экспрессируется ограниченным набором типов клеток, а механизм влияния данного полиморфизма на функцию клеток становится все более и более понятным, существуют предположения, что ZnT8 может стать новой лекарственной мишенью для увеличения секреции инсулина у пациентов с СД [46].

При этом для многих генов, выявленных GWAS, механизм влияния в патогенезе СД на настоящий момент не вполне понятен, и его только предстоит установить. Так, ген *HHEX* неоднократно идентифицировался в разных популяциях (в европейской и азиатской) как связанный с СД2. Расположенный на хромосоме 10q, этот ген является членом семейства гомеобокс и кодирует транскрипционный фактор, связанный с сигнализацией Wnt. ОШ для гомозигот, несущих аллели риска rs5015480, составляет 1,5 [44].

Несмотря на существенные достижения GWAS, необходимо отметить и некоторые недостатки данного подхода, в частности относительно грубое фенотипирование. Поскольку размер выборки имеет первостепенное значение для достижения достаточной статистической мощности, GWAS обычно проводят в очень больших популяционных когортах, где возможны только ограниченное фенотипирование, простые методы для оценки функции  $\beta$ -клеток или чувствительности к инсулину, такие как глюкоза натощак или инсулин крови, а не более физиологичные и точные динамические тесты (например, клэмп).

Кроме того, существует ряд проблем, связанных с интерпретацией данных GWAS и заключительной оценкой связи выявленных локусов с развитием СД. Во-первых, GWAS идентифицируют новые локусы, которые определяются блоками равновесного сцепления (гаплотипы), а не идентифицируют причинный(е) генетический(е) вариант(ы). Хотя бывают идентифицированы и небольшие геномные области с установлением одного SNP. Дальнейшие повторные секвенирования и составление генетических карт (fine-mapping) могут выявлять дополнительные SNP, в том числе те, которые являются причинами в этиопатогенезе болезни. Во-вторых, SNP, которые наиболее достоверно связаны с заболеванием, обычно расположены в некодирующих областях, часто не имеющих очевидной функции. Такие SNP, по-видимому, изменяют экспрессию соседнего гена посредством связывания дифференци-

ального транскрипционного фактора или путем влияния на сплайсинг генов. На сегодняшний день существует несколько опубликованных примеров, в которых идентифицированные SNP коррелируют со связыванием транскрипционного фактора. В-третьих, SNP, которые связаны с заболеванием, не обязательно являются функциональными (поскольку они могут влиять на другой ген, что и приводит к фенотипическому признаку) [25].

Были предложены и продолжают совершенствоваться математические подходы для анализа результатов GWAS и решения вышеописанных проблем [15, 44]. Функциональная идентификация причинных генов в ассоциированном с заболеванием локусе и определение их патофизиологической роли являются важным шагом к новому биологическому пониманию и определению потенциальных мишеней для терапии СД2 [47].

### Методы редактирования генома: новые возможности в изучении генетики сахарного диабета 2-го типа

Одним из основных подходов к установлению роли различных мутаций в генах остается использование отдельных клеточных линий или целых организмов, в которых можно манипулировать экспрессией генов-кандидатов в конкретных типах клеток. Методы внесения изменений в ДНК могут позволить понять функции генов и влияние изменений в их последовательности на патогенез сложных заболеваний, установить причинно-следственную связь между SNP и фенотипом.

Разработка методов редактирования генома стала возможна после открытия двойной спирали ДНК. На раннем этапе в середине XX в. было показано, что скорость мутагенеза может быть усилена радиацией или обработкой химическими веществами. Более поздние методы основывались на вставках транспозонов, которые могли быть индуцированы в некоторых организмах, что приводило к изменениям в случайных участках генома. В конце XX в. впервые были успешно получены целевые геномные изменения [50]. Нацеливание осуществлялось при помощи олигонуклеотидов, малых молекул или интронов со способностью к аутосплайсингу, которые могут сайт-специфично распознавать последовательности ДНК; получение вариаций зависело от процесса гомологичной рекомбинации, который был чрезвычайно точен, но очень неэффективен [51].

Таким образом, серьезным ограничением для широкого применения данного метода являлись сложность, специфический характер вносимых изменений и низкая эффективность, а также требуемые впоследствии мощная селекция и тщательная характеристика полученных образцов. Однако огромный потенциал использования изменения ДНК, как для фундаментальных, так и для практических исследований, привел к стремительному развитию технологий модификации генома. В течение последних двух десятилетий появились 3 новых метода, сочетающие в себе возможность с высокой точностью распознавать целевые участки ДНК и способность вносить разрыв в ее двойную спираль: ZFNs (нуклеазы с цинковыми пальцами), TALENs (нуклеазы на базе эффекторов, подобных транскрипционным активаторам) и система CRISPR/Cas9 [27]. Все три инструмента, индуцируя двуцепочечный разрыв (DSB) ДНК, запускают механизмы эндогенного восстановления ДНК, такие как NHEJ (механизм негомологичного соединения концов)

в отсутствие гомологичной ДНК-матрицы или HDR (гомологически-направленная репарация) с участием гомологичной ДНК (рис. 2).

Система CRISPR/Cas9 появилась как альтернатива ZFNs и TALENs и стала самой перспективной из предложенных. В основе данной технологии лежит бактериальная система адаптивного иммунитета CRISPR-Cas II типа, обеспечивающая устойчивость бактерий к чужеродной ДНК. Белок Cas9 относится к группе эндонуклеаз, которые используют направляющую последовательность в структуре РНК-дуплекса (tracrRNA) — crRNA для распознавания целевой ДНК и последующего внесения сайт-специфичного DSB. В настоящее время данная система адаптирована и модифицирована для различных целей. В частности, объединение tracrRNA и crRNA в единую направляющую гид-РНК (sgRNA) позволило создать простую двухкомпонентную систему, которая при изменении только в направляющей последовательности sgRNA обеспечивает наведение нуклеазы Cas9 на любую интересующую последовательность ДНК [22] (см. рис. 2).

Несмотря на некоторое несовершенство (нецелевые эффекты, повторное разрезание целевого сайта), технология CRISPR обладает рядом преимуществ, а именно простотой программирования, уникальным механизмом разрезания ДНК, а также наличием множества природных и созданных вариантов, что привело к ее широкому использованию для внесения модификаций в геном культивируемых клеток млекопитающих и получения трансгенных животных (путем инъекции sgRNA и мРНК, кодирующей Cas9, в эмбрионы). Достижения в разработке методов направленного мутагенеза и редактирования генома значительно расширяют возможности использования модельного подхода, однако остается вопрос о выборе конкретных организмов [23].

Из доступных моделей на настоящий момент мыши представляют собой оптимальный компромисс между легкостью генетической манипуляции и сходством с человеком с точки зрения как структуры генома, так и физиологии. Такие модели обеспечивают доступ ко всем тканям и возможность провести детальный физиологи-

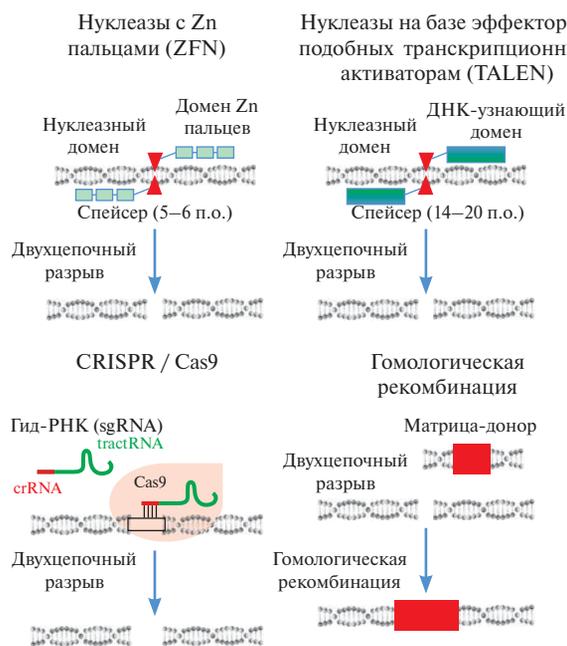


Рис. 2. Схема механизма действия современных методов редактирования генома

ческий анализ *in vivo*. Используя комбинацию различных аллелей мыши, можно установить, какой ген-кандидат в конкретном локусе болезни ассоциируется с заболеванием у людей, а также обеспечить функциональный анализ вариантов через аллельный ряд, включая анализ гипоморфной и гиперморфной мутаций, нокаут и сверхэкспрессию. Фенотипирование этих аллелей для конкретных интересующих признаков в сочетании с функциональным анализом генетических вариантов может помочь выявить молекулярный и клеточный механизм действия на развитие заболевания человека, в том числе и для СД2.

Так, мыши, несущие мутации с усилением функции в *KCNJ11* (т.е. каналльно-открытые мутации), которые приводят к NDM у людей, имеют фенотип, очень схожий с фенотипом болезни человека, и представляют собой ценный инструмент для исследования патологии и физиологии этого заболевания. Это иллюстрируется в исследовании специфической  $\beta$ -клеточной экспрессии трансгенных мышей, несущих вариант гена *KCNJ11* с хорошо охарактеризованной человеческой мутацией V59M. Более того, изучение влияния данной мутации на функционирование нейронов и мышц показывает, что мышечная слабость, наблюдаемая у некоторых пациентов с NDM, имеет неврологическое происхождение, т.е. лечение миопатий потребует препаратов, которые могут пройти гематоэнцефалический барьер. В целом эти исследования демонстрируют важность тканеспецифических моделей мыши для выявления новых терапевтических стратегий и поиска специфичной лекарственной терапии [27].

Кроме того, использование модели мыши позволяет учесть экзогенные факторы, влияющие на развитие заболевания: особенно это важно для изучения патогенеза СД2, в значительной степени зависящего от факторов окружающей среды. В этом контексте можно упомянуть, например, исследование, в котором животные с нокаутом *ZnT8* (ген *SLC30A8*) поддерживались на диете с высоким содержанием жира (high fat diet, HFD). У нокаутных мышей *ZnT8* наблюдалось увеличение массы тела, сопровождаемое гиперинсулинемией и гипергликемией натошак по сравнению с контролем дикого типа. В одном из исследований после воздействия HFD у 50% нокаутных животных *ZnT8* развивалась гипергликемия, в то время как у контрольных животных такого эффекта не наблюдалось [37].

В научном сообществе возлагают большие надежды на использование методов редактирования генома на мышечных моделях, в связи с чем уже сейчас ученые объединяют усилия по всему миру для эффективной организации исследовательского процесса и создают международные консорциумы. Так, целью международного консорциума Knockout-mouse является получение мутаций во всех генах, кодирующих мышечные белки, и систематическое создание ген-нацеливающих и ген-ловушечных конструкций в эмбриональных стволовых клетках C57BL/6N (<http://www.knockoutmouse.org>). Другие программы, такие как EUMODIC и Международный консорциум по фенотипированию мышей, планируют проводить систематическое высокопроизводительное фенотипирование линий мышей для проверки влияния мутаций, выявленных GWAS, на индекс массы тела и уровень глюкозы в крови (<http://www.eumodic.org/>) [37, 52].

Несмотря на столь позитивную оценку перспективы использования мышечных моделей, необходимо учитывать ряд значимых проблем, связанных с этим подходом.

Одной из таких проблем является относительная пластичность, проявляемая грызунами, сталкивающимися с делециями генов. Из-за этого обычно наблюдаются различия в степени влияния мутаций в генах человека (например, для генов *MODY*) с их эквивалентами у мыши, демонстрирующие гораздо менее выраженные нарушения гликемии или другие изменения, которые видны только при удалении обоих аллелей. Еще одним очевидным ограничением в случае сравнения с мышечными моделями являются их параметры (вес ~25 г, продолжительность жизни ~3 года). Кроме того, многие из SNP, идентифицированные в настоящее время как связанные с риском развития СД2, находятся в межгенных областях и интронах. Часто такие последовательности SNP располагаются внутри повторяющихся элементов и отсутствуют у мышей: например, последовательности, охватывающие SNP rs7903146 для гена *TCF7L2*. В таких случаях удобной альтернативой является использование более простых клеточных линий человека в сочетании с новыми технологиями редактирования генома для изучения вклада вариантов риска [37]. На клеточные модели также не распространяется уже упомянутая проблема пластичности мышечного генома, и они функциональны при оценке влияния SNP на чувствительность к лекарственным препаратам.

В настоящий момент двумя основными типами клеток, используемых с целью реализации стратегии установления причинно-следственных связей *in vitro* для генетических изменений в интронах и межгенных областях, являются индуцированные плюрипотентные стволовые клетки и первичные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) человека [53]. Также можно вводить встречающиеся в природе мутации или варианты гена в клетки линий эмбриональных стволовых клеток или МСК и дифференцировать их соответственно с изучением механизмов заболевания [46]. Комбинирование иммортализованных культур клеток человека с методами редактирования генома дает возможность получить стандартизированные модели в воспроизводимых условиях и элиминировать влияние внешних факторов, которым подвержен каждый индивидуальный донор. Если рассматривать модели для изучения SNP на основе клеточного материала, полученного от пациента, то в общем стратегия их получения с помощью инструментов для редактирования генома состоит из нескольких этапов (рис. 3): получение клеток от пациентов, несущих разные генотипы (например, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки и/или МСК человека); мутирование нормальных или коррекция мутантных аллелей; дифференцировка полученных клеток в клетки поджелудочной железы или клетки-мишени, такие как миоциты, адипоциты и гепатоциты.

Важно отметить, что вне зависимости от выбора модели для редактирования генома (клеточной или мышечной) главное преимущество данного подхода заключается в возможности установления причинно-следственной связи между изменениями в геноме и биологическим эффектом, возникающим фенотипом. В частности, в исследованиях, использующих методы редактирования ДНК, были определены конкретные механизмы влияния генов на функцию  $\beta$ -клеток [23] и нескольких SNP — на побурение жировой ткани [45] и на экспрессию *PPARG* [24]. В своем исследовании Н. Zeng и соавт. выполнили CRISPR-опосредованный нокаут в эмбриональных стволовых клетках человека генов-кандидатов, идентифицированных в GWAS для СД2 (*CDKAL1*, *KCNJ11* и *KCNQ1*). Затем авторы исследовали функциональные эффекты

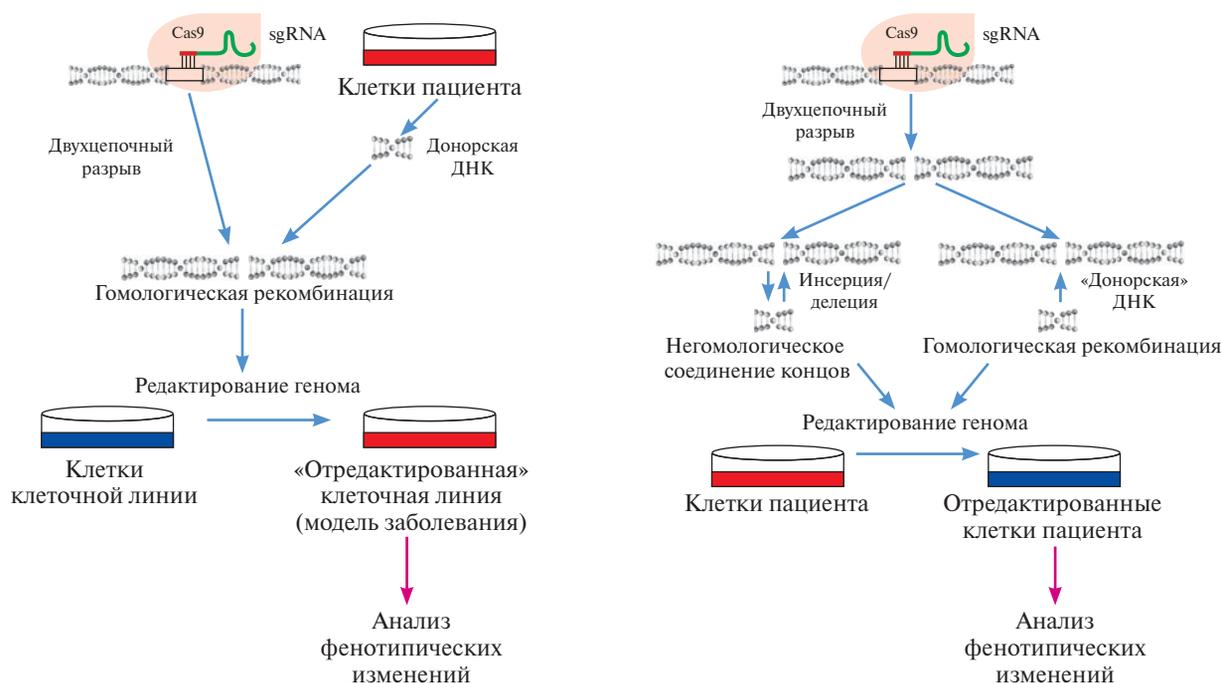


Рис. 3. Стратегия получения модельных линий клеток для изучения SNP с помощью методов редактирования генома

удаления этих генов на функцию  $\beta$ -клеток путем направленной дифференцировки этих линий в  $\beta$ -клетки [23]. И хотя делеция этих генов не повлияла на дифференцировку  $\beta$ -клеток, SC- $\beta$ -клетки из каждой линии нокаута эмбриональных стволовых клеток проявляли нарушение секреции инсулина, а в случае *CDKAL1* — гиперчувствительность к глюколипотоксичности. В данном случае было достоверно показано, как генетические вариации, идентифицированные GWAS, могут трансформироваться в  $\beta$ -клеточную дисфункцию и отражать причинно-следственную связь.

В работе М. Claussnitzer и соавт. [45] была осуществлена проверка данных, полученных с помощью GWAS, о нескольких SNP в локусе гена *FTO*. Было установлено, что только rs1421085 оказывает эффект на побурение жировой ткани. С помощью метода CRISPR-Cas9 была проведена коррекция полиморфизма rs1421085 в первичных МСК, полученных от пациентов с аллелями риска, и тем самым в дальнейшем определен механизм данного эффекта через восстановление репрессии связанных с функцией *FTO* генов *IRX3* и *IRX5*.

Влияние SNP rs4684847, находящегося в регуляторной области, на экспрессию *PPARG* было доказано в более ранней работе М. Claussnitzer и соавт. [24]. В этом исследовании было подтверждено снижение экспрессии белка PPAR  $\gamma$  в первичных МСК, полученных из жировой ткани носителей аллели риска. После редактирования генома с помощью метода CRISPR/Cas9 в линии клеток человеческих преадипоцитов SGBS и замены эндогенного аллеля риска на нормальный был установлен механизм данного эффекта через изменение в области связывания транскрипционного фактора (paired related homeobox 1, PRXX1) [15].

### Заключение

Существует множество подходов к поиску новых SNP в геноме человека, их каталогизации и описанию,

из них можно выделить четыре основных: изучение редких семейных форм, исследование генов-кандидатов и анализ групп сцепления в популяционных исследованиях типа «случай—контроль», полногеномные ассоциативные исследования и редактирование генома в клеточных и мышиных моделях. Каждый из указанных подходов, обладая определенными преимуществами и недостатками, внес вклад в понимание генетических основ СД2.

Первый подход предполагает изучение моногенного СД и наследственных синдромов, включающих фенотипические признаки инсулинорезистентности, рассматривая их как упрощенные частичные модели СД2. Единая и четко определенная молекулярная причина, лежащая в основе таких заболеваний, позволяет отследить связь между дефектными генами, биохимической или регуляторной дисфункцией и клиническим фенотипом, что дает возможность обнаружить некоторые генетические пути, имеющие принципиальное значение для общей популяции.

Применение анализа групп сцепления и анализа ассоциации привело к накоплению достаточного объема статистических данных о генетических корреляциях, связанных с СД2. Однако они часто характеризуются противоречивостью и невоспроизводимостью. Этот недостаток был устранен в полногеномных ассоциативных исследованиях при помощи создания международных мультиэтнических консорциумов (HarMap, Wellcome Trust Case Control Consortium — WTCCC, и др.). Благодаря этому подходу было открыто большое количество новых локусов, влияющих на риск развития метаболических заболеваний, однако по-прежнему значимой оставалась проблема установления прямых причинно-следственных связей между отдельными генетическими вариантами и конкретными биологическими эффектами.

В настоящее время благодаря развитию технологий редактирования генома и упрощению процедуры создания модельных животных и клеток, появилась возмож-

ность проверки результатов GWAS экспериментальным способом — путем искусственного внесения одиночных нуклеотидных замен в геном, а потом их обратного исправления с подробным описанием фенотипических изменений. Использование данного подхода осложняет тот факт, что SNP, вызывающие заболевания, не существуют изолированно. Генетические особенности каждого человека играют определенную роль в риске развития болезни у конкретного индивидуума. В частности, риск СД2 является накопительным: чем большее количество SNP присутствует в геноме человека, тем выше риск развития заболевания. Таким образом, с целью создания адекватных моделей потребуется введение более чем одной генетической замены для моделирования фенотипа, характерного для сахарного диабета, с соответствующей комбинацией генетических вариаций.

Несмотря на возможные трудности, быстрый прогресс, достигнутый в области обнаружения генетических особенностей, и использование многопрофильного подхода для преодоления экспериментальных ограничений позволят, вероятно, в ближайшие годы глубже разобраться в генетике сахарного диабета 2-го типа.

### Дополнительная информация

**Источник финансирования.** Поисково-аналитическая работа проведена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант РНФ №14-35-00026).

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Участие авторов:** А.В. Степанова, К.Ю. Кулебякин, Т.Н. Кочегура — подбор и анализ литературы, обобщение научных гипотез; М.В. Шестакова и В.А. Ткачук — формулировка основных положений обзора, руководство процессом написания рукописи. Все авторы внесли существенный вклад в проведение работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

**Выражение признательности.** Авторы выражают глубокую благодарность М.Н. Карагаюру за продуктивное обсуждение и критические замечания при подготовке статьи.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Дедов И.И., Смирнова О.М., Кононенко И.В. Значение результатов полногеномных исследований для первичной профилактики сахарного диабета 2-го типа и его осложнений. Персонализированный подход // *Сахарный диабет*. — 2014. — Т.17. — №2 — С. 10–19. [Dedov II, Smirnova OM, Kononenko IV. Significance of the results of genome-wide association studies for primary prevention of type 2 diabetes mellitus and its complications. Personalised approach. *Diabetes mellitus*. 2014;17(2):10–19. (In Russ).] doi: 10.14341/DM2014210-19.
2. Kim S, Misra A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annu Rev Biomed Eng*. 2007;9:289–320. doi: 10.1146/annurev.bioeng.9.060906.152037.
3. Maurano MT, Humbert R, Rynes E, et al. Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA. *Science*. 2012;337(6099):1190–1195. doi: 10.1126/science.1222794.
4. Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 2001;409(6822):928–933. doi: 10.1038/35057149.
5. Goodarzi MO. Genetics of obesity: what genetic association studies have taught us about the biology of obesity and its complications. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018;6(3):223–236. doi: 10.1016/s2213-8587(17)30200-0.
6. Sandholm N, Groop PH. Genetic basis of diabetic kidney disease and other diabetic complications. *Curr Opin Genet Dev*. 2018;50:17–24. doi: 10.1016/j.gde.2018.01.002.
7. Кононенко И.В., Майоров А.Ю., Кокшарова Е.О., Шестакова М.В. Фармакогенетика сахароснижающих препаратов // *Сахарный диабет*. — 2015. — Т.18. — №4 — С. 28–34. [Kononenko IV, Mayorov AY, Koksharova EO, Shestakova MV. Pharmacogenetics of hypoglycemic agents. *Diabetes mellitus*. 2015;18(4):28–34. (In Russ).] doi: 10.14341/DM7681.
8. Roses AD. Pharmacogenetics and the practice of medicine. *Nature*. 2000;405(6788):857–865. doi: 10.1038/35015728.
9. Willemssen G, Ward KJ, Bell CG, et al. The concordance and heritability of type 2 diabetes in 34,166 twin pairs from international twin registers: the Discordant Twin (DISCOTWIN) Consortium. *Twin Res Hum Genet*. 2015;18(6):762–771. doi: 10.1017/thg.2015.83.
10. cdc.gov [Internet]. National Diabetes Statistics Report [cited 2019 Feb 12]. Available from: <https://www.cdc.gov/diabetes/data/statistics/statistics-report.html>.
11. Fajans SS, Bell GI. MODY: history, genetics, pathophysiology, and clinical decision making. *Diabetes Care*. 2011;34(8):1878–1884. doi: 10.2337/dc11-0035.
12. Polak M, Cavé H. Neonatal diabetes mellitus: a disease linked to multiple mechanisms. *Orphanet J Rare Dis*. 2007;2:12. doi: 10.1186/1750-1172-2-12.
13. Naylor RN, Greeley SA, Bell GI, Philipson LH. Genetics and pathophysiology of neonatal diabetes mellitus. *J Diabetes Investig*. 2011;2(3):158–169. doi: 10.1111/j.2040-1124.2011.00106.x.
14. Vaxillaire M, Bonnefond A, Froguel P. The lessons of early-onset monogenic diabetes for the understanding of diabetes pathogenesis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2012;26(2):171–187. doi: 10.1016/j.beem.2011.12.001.
15. Dorak MT. *Genetic association studies*. New York, USA: Garland Science; 2016. 240 p. doi: 10.4324/9781315209364.
16. Tabor HK, Risch NJ, Myers RM. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet*. 2002;3(5):391–397. doi: 10.1038/nrg796.
17. Patnala R, Clements J, Batra J. Candidate gene association studies: a comprehensive guide to useful in silico tools. *BMC Genet*. 2013;14:39. doi: 10.1186/1471-2156-14-39.
18. Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, et al. The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2000;26(1):76–80. doi: 10.1038/79216.
19. Kong Y, Sharma RB, Ly S, et al. CDKN2A/BT2D genome-wide association study risk SNPs impact locus gene expression and proliferation in human islets. *Diabetes*. 2018;67(5):872–884. doi: 10.2337/db17-1055.
20. Bush WS, Moore JH. Chapter 11: genome-wide association studies. *PLoS Comput Biol*. 2012;8(12):e1002822. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002822.
21. Cirillo E, Kutmon M, Gonzalez Hernandez M, et al. From SNPs to pathways: biological interpretation of type 2 diabetes (T2DM) genome wide association study (GWAS) results. *PLoS One*. 2018;13(4):e0193515. doi: 10.1371/journal.pone.0193515.
22. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*. 2013;31(7):397–405. doi: 10.1016/j.tibtech.2013.04.004.
23. Zeng H, Guo M, Zhou T, et al. An isogenic human ESC platform for functional evaluation of genome-wide-association-study-identified

- diabetes genes and drug discovery. *Cell Stem Cell*. 2016;19(3):326–340. doi: 10.1016/j.stem.2016.07.002.
24. Claussnitzer M, Dankel SN, Klocke B, et al. Leveraging cross-species transcription factor binding site patterns: from diabetes risk loci to disease mechanisms. *Cell*. 2014;156(1–2):343–358. doi: 10.1016/j.cell.2013.10.058.
  25. Fuchsberger C, Flannick J, Teslovich TM, et al. The genetic architecture of type 2 diabetes. *Nature*. 2016;536(7614):41–47. doi: 10.1038/nature18642.
  26. Molven A, Njolstad PR. Role of molecular genetics in transforming diagnosis of diabetes mellitus. *Expert Rev Mol Diagn*. 2011;11(3):313–320. doi: 10.1586/erm.10.123.
  27. Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet*. 2003;33 Suppl:228–237. doi: 10.1038/ng1090.
  28. Hani EH, Boutin P, Durand E, et al. Missense mutations in the pancreatic islet beta cell inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel gene (KIR6.2/BIR1): a meta-analysis suggests a role in the polygenic basis of Type II diabetes mellitus in Caucasians. *Diabetologia*. 1998;41(12):1511–1515. doi: 10.1007/s001250051098.
  29. Haghverdizadeh P, Sadat Haerian M, Haghverdizadeh P, Sadat Haerian B. ABC8 genetic variants and risk of diabetes mellitus. *Gene*. 2014;545(2):198–204. doi: 10.1016/j.gene.2014.04.040.
  30. Daly AK, Day CP. Candidate gene case-control association studies: advantages and potential pitfalls. *Br J Clin Pharmacol*. 2001;52(5):489–499. doi: 10.1046/j.0306-5251.2001.01510.x.
  31. Brown AE, Walker M. Genetics of insulin resistance and the metabolic syndrome. *Curr Cardiol Rep*. 2016;18(8):75. doi: 10.1007/s11886-016-0755-4.
  32. Gaulton KJ. Mechanisms of type 2 diabetes risk loci. *Curr Diab Rep*. 2017;17(9):72. doi: 10.1007/s11892-017-0908-x72.
  33. Billings LK, Florez JC. The genetics of type 2 diabetes: what have we learned from GWAS? *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1212:59–77. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05838.x
  34. Sandhu MS, Weedon MN, Fawcett KA, et al. Common variants in WFS1 confer risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2007;39(8):951–953. doi: 10.1038/ng2067.
  35. Dorajoo R, Liu J, Boehm BO. Genetics of type 2 diabetes and clinical utility. *Genes (Basel)*. 2015;6(2):372–384. doi: 10.3390/genes6020372.
  36. Klupa T, Skupien J, Malecki M. Monogenic models: what have the single gene disorders taught us? *Curr Diab Rep*. 2012;12(6):659–666. doi: 10.1007/s11892-012-0325-0.
  37. Ali O. Genetics of type 2 diabetes. *World J Diabetes*. 2013;4(4):114–123. doi: 10.4239/wjd.v4.i4.114.
  38. Turner MD, Cassell PG, Hitman GA. Calpain-10: from genome search to function. *Diabetes Metab Res Rev*. 2005;21(6):505–514. doi: 10.1002/dmrr.578.
  39. Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2006;38(3):320–323. doi: 10.1038/ng1732.
  40. Pritchard JK, Przeworski M. Linkage disequilibrium in humans: models and data. *Am J Hum Genet*. 2001;69(1):1–14. doi: 10.1086/321275.
  41. Visscher P, Wray N, Zhang Q, et al. 10 Years of GWAS discovery: biology, function, and translation. *Am J Hum Genet*. 2017;101(1):5–22. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.06.005.
  42. Weijers RN. Risk loci for type 2 diabetes – quo vadis? *Clin Chem Lab Med*. 2009;47(4):383–386. doi: 10.1515/cclm.2009.077.
  43. Watanabe RM. *Statistical issues in gene association studies*. In: DiStefano JK, editor. *Disease gene identification: methods and protocols*. New York, USA: Humana Press; 2011. pp. 17–36.
  44. Liao HK, Hatanaka F, Araoka T, et al. In vivo target gene activation via CRISPR/Cas9-mediated trans-epigenetic modulation. *Cell*. 2017;171(7):1495–1507. doi: 10.1016/j.cell.2017.10.025.
  45. Claussnitzer M, Dankel SN, Kim KH, et al. FTO obesity variant circuitry and adipocyte browning in humans. *N Engl J Med*. 2015;373(10):895–907. doi: 10.1056/nejmoa1502214.
  46. Teo AK, Gupta MK, Doria A, Kulkarni RN. Dissecting diabetes/metabolic disease mechanisms using pluripotent stem cells and genome editing tools. *Mol Metab*. 2015;4(9):593–604. doi: 10.1016/j.molmet.2015.06.006.
  47. Florez JC. Mining the genome for therapeutic targets. *Diabetes*. 2017;66(7):1770–1778. doi: 10.2337/dbi16-0069.
  48. Kato N. Insights into the genetic basis of type 2 diabetes. *J Diabetes Investig*. 2013;4(3):233–244. doi: 10.1111/jdi.12067.
  49. Davidson HW, Wenzlau JM, O'Brien RM. Zinc transporter 8 (ZnT8) and  $\beta$  cell function. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25(8):415–424. doi: 10.1016/j.tem.2014.03.008.
  50. Carroll D. Genome editing: past, present, and future. *Yale J Biol Med*. 2017;90(4):653–659.
  51. Maeder M, Gersbach C. Genome-editing technologies for gene and cell therapy. *Mol Ther*. 2016;24(3):430–446. doi: 10.1038/mt.2016.10.
  52. da Silva Xavier G, Bellomo E, McGinty J, et al. Animal models of GWAS-identified type 2 diabetes genes. *J Diabetes Res*. 2013;2013:906590. doi: 10.1155/2013/906590.
  53. Flannick J, Johansson S, Njolstad PR. Common and rare forms of diabetes mellitus: towards a continuum of diabetes subtypes. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;12(7):394–406. doi: 10.1038/nrendo.2016.50.

### КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

\***Кулбьякин Константин Юрьевич**, к.б.н. [*Konstantin Y. Kulebyakin*, PhD];

**адрес:** Россия, Москва, 119991, Ломоносовский пр-т, д. 27, к. 1 [Faculty of Basic Medicine Lomonosov Moscow State University 27-1, Lomonosovsky av., Moscow 119991 Russia];

**e-mail:** konstantin-kuleb@mail.ru, **SPIN-код:** 7573-8527, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-6954-5787>

**Степанова Александра Владимировна**, аспирант [*Alexandra V. Stepanova*, MD, PhD-student];

**e-mail:** a-stepforward@yandex.ru, **SPIN-код:** 3651-4770, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-5290-0874>

**Кочегура Татьяна Николаевна**, д.м.н. [*Tatyana N. Kochegura*, MD, PhD];

**e-mail:** t\_kochegur@mail.ru, **SPIN-код:** 7122-3731, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-4869-4051>

**Шестакова Марина Владимировна**, д.м.н., профессор, академик РАН [*Marina V. Shestakova*, MD, PhD, Professor];

**e-mail:** nephro@endocrincentr.ru, **SPIN-код:** 7584-7015, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-5057-127X>

**Ткачук Всеволод Арсеньевич**, д.б.н., профессор, академик РАН [*Vsevolod A. Tkachuk*, PhD, Professor];

**e-mail:** tkachuk@fbm.msu.ru, **SPIN-код:** 5515-4266, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-7492-747X>