

УДК 616.711-007.5-084:577.214

АНАЛИЗ ОДНОНУКЛЕОТИДНЫХ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МАРКЕРОВ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К ИДИОПАТИЧЕСКОМУ СКОЛИОЗУ

Кузнецов С.Б., Михайловский М.В.

ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, e-mail: niito@niito.ru

В обзоре литературы проанализированы 49 однонуклеотидных полиморфных локусов, для которых была показана статистически достоверная связь с предрасположенностью к идиопатическому сколиозу и обосновано их включение в список маркеров заболевания для создания прогностической тест-системы на основе ДНК-микрочиповой технологии. Весь набор маркеров состоит из 79 однонуклеотидных полиморфных локусов, 30 из которых были проанализированы в нашем предыдущем обзоре (2016). Для некоторых из этих молекулярных маркеров показана положительная ассоциация не только с риском развития самого заболевания, но и с его прогрессом. Проведенный анализ показал, что практически все эти полиморфные локусы, а по сути своей мутации, являются именно маркерами, а не причинами идиопатического сколиоза, поскольку они не изменяют нуклеотидные последовательности в кодирующих частях генов, так или иначе связанных с развитием соединительных тканей в организме. ДНК-микрочип для определения генетической предрасположенности к сколиозу разрабатывается в Новосибирском НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна для помощи ортопедам в выявлении рисков возникновения заболевания, предсказания тяжести его протекания и определения стратегии его лечения.

Ключевые слова: молекулярные маркеры, полиморфные локусы, идиопатический сколиоз, ДНК-микрочип

ANALYSIS OF SINGLE POLYMORPHIC LOCI AS POTENTIAL MARKERS OF PREDISPOSITION TO IDIOPATHIC SCOLIOSIS

Kuznetsov S.B., Mikhaylovskiy M.V.

Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n.a. Ya.L. Tsivyan, Novosibirsk, e-mail: niito@niito.ru

The literature review has analyzed 49 single nucleotide polymorphic loci, for which a statistically significant association with predisposition to idiopathic scoliosis was shown, and their inclusion in the list of disease markers to create a prognostic test system based on DNA microarray technology was justified. The entire set of markers consists of 79 single nucleotide polymorphic loci, 30 of which were analyzed in our previous review (2016). For some of these molecular markers a positive association is shown not only with the risk of developing the disease itself, but also with its progress. The analysis demonstrated that almost all these polymorphic loci, i.e. mutations, are markers, rather than causes of idiopathic scoliosis, since they do not alter the nucleotide sequences in the coding parts of the genes, one way or another connected with the development of connective tissues in the body. A DNA microchip for determining genetic predisposition to scoliosis is being developed at the Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics named after Ya.L. Tsivyan, to help orthopedists in identifying the risks of a disease, predicting the severity of its occurrence, and determining the strategy for its treatment.

Keywords: molecular markers, single nucleotide polymorphic loci, idiopathic scoliosis, DNA microarray

Идиопатический сколиоз [ИС или (IS) Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) number 181800)] характеризуется трехмерной деформацией грудного и/или поясничного отдела позвоночника, причем ведущую роль в механогенезе деформации играет торсия (скручивание вокруг вертикальной оси). Если определять идиопатический сколиоз как искривление позвоночника (угол Кобба) по крайней мере в 10°, то он является наиболее частой деформацией позвоночника и встречается от 0,5% до 10% подростков во всех человеческих популяциях. Бурное развитие заболевания обычно случается в период быстрого роста в подростковом возрасте и характеризуется двумя выраженными факторами риска – потенциалом роста и принадлежностью к жен-

скому полу. Начальные стадии развития заболевания часто остаются незамеченными, поскольку не доставляют пациентам явных неудобств. Обычно идиопатический сколиоз выявляется попутно в ходе медицинских осмотров по другим поводам, в ходе плановых осмотров школьников или при плановой флюорографии. Нередко деформации позвоночника у детей выявляются на стадиях, когда угол Кобба превышает 10°. Под определение «идиопатический сколиоз» попадают все деформации позвоночника, развившиеся без видимых причин после рождения ребенка (Scoliosis Research Society). При этом выделяется также и врожденный сколиоз, и в медицине часто под этим понимают деформации позвоночника, заметные при рождении ребенка. Собственно, меди-

цинская классификация сколиозов в основном и строится на этих отличиях. Недавнее исследование на больших популяционных выборках с участием одно- и разнояйцовых близнецов достоверно показало, что заболевание идиопатическим сколиозом генетически детерминировано. Закономерно возникла необходимость попытаться найти генетические основы этого заболевания, то есть, гены, мутации в которых могут вызывать развитие сколиоза.

В предыдущих обзорах [1, 2] были представлены данные из литературных источников о связи ряда генов и мутаций в них с развитием и протеканием идиопатического сколиоза. Мутации – суть изменения нуклеотидной последовательности – могут являться не только причинами каких-либо заболеваний, но и быть молекулярными маркерами этих заболеваний, если они не затрагивают важных частей генов, или находятся в некодирующих частях генов, или находятся в межгенных промежутках, и для них показана корреляция с заболеванием, что позволяет использовать их в разработке инструмента или метода для выявления генетической предрасположенности к заболеванию. Набор молекулярных признаков (маркеров) сколиоза, обнаруженных в публикациях, оказался достаточно большим, что определило выбор ДНК-микрочиповой технологии как наиболее подходящей, для анализа геномов на наличие таких маркеров. Созданный ДНК-микрочип позволит одновременно анализировать все помещенные на него маркеры и получать важную информацию о генетическом статусе пациента, т.е. о наличии у него молекулярных признаков (маркеров), связанных с развитием сколиоза. Такой анализ, сделанный в раннем возрасте, позволит выявлять детей с риском развития у них сколиоза, в некоторых случаях определять характер протекания заболевания и прогнозировать результаты лечения. Дети с высоким риском развития сколиоза будут находиться под пристальным наблюдением, проходить частые медицинские освидетельствования для того, чтобы выявить развитие заболевания на ранних стадиях и принять правильное и своевременное решение о выборе метода лечения – консервативного либо хирургического.

В Новосибирском НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна разрабатывается ДНК-микрочип, для которого был сформирован набор однонуклеотидных полиморфных локусов (ОНП) или в английском варианте «single nucleotide polymorphism» (SNP) для размещения на микрочипе. Этот набор не является фиксированным, он мо-

жет быть как уменьшен, так и существенно расширен, поскольку технология позволяет добавлять на микрочип тысячи новых маркеров. Насколько известно авторам, подобной тест-системы в России и в мире нет. Для этого был собран список генетических маркеров сколиоза, для которых была выявлена достоверная связь с заболеванием. Основное количество научных публикаций основано на результатах, полученных на выборках пациентов из Юго-Восточной Азии: Китай, Корея, Япония. Небольшая часть публикаций приходится на регионы Западной Европы: Италия, Финляндия, Испания. Подобные исследования не проводились на территории России вообще и в Сибирском регионе в частности. Популяции россиян могут быть по-своему уникальными, поскольку формировались и развивались в значительной степени изолировано от Юго-Востока Азии и от Западной Европы, а потому в них могут быть свои специфические генетические маркеры, либо частоты известных маркеров в них могут быть отличными от других популяций. Испытания созданного ДНК-микрочипа на выборке пациентов Новосибирского НИИТО им. Я.Л. Цивьяна, в клинике которого проходят лечение жители всего сибирского региона, включая Дальний Восток и среднеазиатские страны, позволит выявить пригодность выбранных ОНП и корректно сформировать список наиболее часто встречающихся на территории Сибири генетических маркеров сколиозов.

В настоящем обзоре, который является продолжением предыдущего [2], представлен анализ 50 молекулярных маркеров, обнаруженных в научных публикациях, из которых 49 включены в список потенциальных маркеров идиопатического сколиоза. Таким образом, общее число маркеров, внесенных в список, равно 79. Обозначения однонуклеотидных полиморфных локусов и генов приводятся в соответствии с общепринятыми аббревиатурами. Полную информацию об однонуклеотидных полиморфизмах можно найти на сайте National Center for Biotechnology Information. Считаю необходимым дать некоторые определения, которые используются в данном обзоре.

Однонуклеотидный полиморфный локус по своей сути является точечной мутацией, то есть изменением некоторой последовательности нуклеотидов, принятой за каноническую. А полиморфизм, как явление, появился вследствие мутаций. Во многих публикациях, особенно медицинской направленности, принято считать, что мутация – это изменение, приводящее к вредным для организма последствиям,

а ОНП – нейтрален по сути. Однако в упомянутой базе данных для каждого ОНП в разделе «клиническое значение» указано, является он патогенным или нет. Как и при использовании термина «мутация», аллели принято обозначать как «нормальный» или «дикий» и «мутантный», так и мы обозначали аллели при использовании термина «ОНП». В базе данных, как правило, «нормальной» обозначена наиболее распространенная аллель. Мы придерживались таких же обозначений аллелей. Полные названия генов в обзоре приведены на английском языке, потому что для многих из них нет адекватных названий на русском, и эти названия приводятся в соответствии с международными названиями National Center for Biotechnology Information.

C17orf67 – Открытая рамка считывания 67 на хромосоме 17. Китайская группа исследователей [3] обнаружила достоверную связь аллели А однонуклеотидного полиморфного локуса rs4794665 с ускоренным ростом в подростковый период и увеличенным ростом у взрослых и показала, что носительство этой аллели является фактором риска развития идиопатического сколиоза. Однако наличие этой аллели никак не связано со степенью искривления позвоночника. Американские исследователи [4] на выборке из 8184 подростков европейского происхождения такой связи не выявили, как и большая международная группа в своем метаанализе однонуклеотидных полиморфизмов, связанных со скоростью роста у подростков [5]. Однако другой международный коллектив авторов [6] показал, что частоты минорных аллелей некоторых полиморфных локусов, в частности rs4794665, являются этнически специфичными, то есть сильно различающимися в кавказской и монголоидной расах, по крайней мере, у китайцев. По данным проекта «1000 геномов» частота аллели А в восточноазиатской популяции равна 19,5%, а в европейской – 47,4%. Мы внесли локус rs4794665 в список потенциальных маркеров сколиоза, поскольку популяция Сибирского федерального округа имеет свои особые характеристики (см. ниже).

Ген LBX1-AS1 (Ladybird Homeobox 1 – Antisense RNA 1). Китайские исследователи [7] на выборке из 513 пациентов показали, что аллель G однонуклеотидного полиморфного локуса rs625039, находящегося в интроне гена, статистически достоверно связана с предрасположенностью к идиопатическому сколиозу, однако они не выявили связи этой аллели со степенью искривления позвоночника (угол Кобба). Группа исследователей из Японии [8]

в двухстадийном исследовании ассоциаций маркеров и признаков на общей выборке в 12 тысяч участников также показали достоверную связь аллели G локуса rs625039 с предрасположенностью к сколиозу. И еще одна группа из Китая [9] показала в метаанализе, основанном на обследовании 34626 индивидов, что эта аллель увеличивает предрасположенность к сколиозу у азиатов. Частота аллели G в азиатской популяции согласно проекту «1000 геномов» равна 65,3%, а в европейской популяции – 87,9%, однако, мы не обнаружили исследований связи аллели G локуса rs625039 с предрасположенностью к сколиозу, проведенных на выборках из популяций европейцев. Тем не менее мы внесли этот полиморфизм в список маркеров сколиоза для размещения на микрочипе. Другая группа китайских ученых [10] провела исследования геномов 4317 пациентов женского пола из китайской популяции с диагностированным подростковым идиопатическим сколиозом, у которых угол кривизны позвоночника (угол Кобба) был более 20°. Они обнаружили достоверную связь с заболеванием однонуклеотидного полиморфного локуса rs678741, находящегося в интроне гена LBX1AS1. В трех репликативных анализах частота аллели А в группе пациентов достоверно превышала частоту этой аллели в контрольных группах. Средняя частота в европейской популяции минорной аллели А, которая, по видимому, является аллелью риска, равна 56,4%, в азиатской – 43,6%. Локус rs678741 внесен в наш список маркеров предрасположенности к сколиозу.

Район 10q24.31, рядом с геном LBX1 (Ladybird Homeobox 1). Скандинавские исследователи [11] на выборке из 1739 пациентов показали, что полиморфный локус rs11190870, расположенный ниже гена LBX1, с высокой степенью достоверности связан с развитием идиопатического сколиоза. Японские исследователи [12] в полногеномном поиске ассоциаций, в который были вовлечены 1376 японских девочек с подростковым идиопатическим сколиозом, выявили статистически достоверную ассоциацию локуса с заболеванием. Упомянутая выше группа китайских ученых [9] в метаанализе, основанном на исследовании 34626 субъектов, показали строгую связь аллели T полиморфного локуса rs11190870 с предрасположенностью к сколиозу у азиатов. Канадские ученые [13] в метаанализе показали строгую связь этого локуса с идиопатическим сколиозом у восточноазиатов. И, наконец, группа американских исследователей [14] обнаружила, что локус rs11190870 находится в умеренном

неравновесном сцеплении с другим полиморфным локусом rs1190878, который расположен выше гена LBX1 и у которого авторы нашли очень строгую ассоциацию с предрасположенностью к сколиозу. Фактором риска является аллель Т локуса rs1190870, и частота этой аллели в восточноазиатской популяции равна 53,9%, а в европейской – 59,1%. С самой высокой частотой (70,1%) эта аллель встречается в популяциях южной Азии. На основании всех приведенных данных мы включили локус rs1190870 в наш список маркеров идиопатического сколиоза. Локус rs1190878 мы также внесли в наш список маркеров, хотя о его связи с предрасположенностью к сколиозу упомянуто только в одном исследовании [14]. Ассоциацию еще одного полиморфного локуса rs11598564, расположенного вблизи гена LBX1, с предрасположенностью к идиопатическому сколиозу показали уже упоминавшиеся здесь группы исследователей из Японии [8] и Китая [9]. Их выводы об этой ассоциации были подтверждены метаанализом [15].

Ген CALM1 (Calmodulin 1). Китайские исследователи [16] показали, что однонуклеотидные полиморфные локусы rs2300496, rs2300500 и rs3213718, расположенные в интронах гена калмодулина I надежно коррелируют с предрасположенностью к идиопатическому сколиозу. Аллели С локуса rs2300496, G локуса rs2300500 и С локуса rs3213718 достоверно чаще встречаются в группах пациентов с диагностированным сколиозом, и гомозиготность по любому из этих аллелей сильно увеличивает риск развития сколиоза у носителей таких генотипов. Объединение аллелей риска в гаплотип CGC еще более увеличивает шанс появления сколиоза. Однако авторы не обнаружили какой-либо связи между аллелями риска, разными генотипами и их сочетаниями в гаплотипах и тяжестью протекания заболевания. Индийские ученые [17] на выборке из 695 пациентов выявили статистически значимую связь полиморфного локуса rs3213718 с тяжелой дегенерацией межпозвоночных дисков в поясничном отделе позвоночника. Частоты аллелей риска в разных популяциях следующие: аллель С локуса rs2300496 в Восточной Азии 80,6%, в Европе – 41,8%, в Южной Азии – 60,2%; аллель G локуса rs2300500 в Восточной Азии 80,6%, в Европе – 41,8%, в Южной Азии 60,2%; аллели С локуса rs3213718 в Восточной Азии 78,5%, в Европе – 39%, в Южной Азии – 56,7%. Все три локуса мы внесли в наш список маркеров идиопатического сколиоза. Исследовательская группа из Китая [18, 19] показала, что

еще два однонуклеотидных полиморфных локуса: rs12885713, локализованный в промоторе гена CALM1, и rs5871 из 3'-нетранслируемой области того же гена находятся в статистически достоверной ассоциации с предрасположенностью к идиопатическому сколиозу. Мутантные аллели Т обоих локусов достоверно чаще встречаются у пациентов с двойной кривизной позвоночника, большим (более 40°) углом Кобба и апикальной локализацией (между T2 и T11-12) основной кривизны. В ранней работе [20] эти авторы показали достоверные различия в частотах аллели Т локуса rs12885713 в группе пациентов с двойной кривизной позвоночника и в контрольной группе, и частотах аллели Т локуса rs5871 у пациентов с кривизной в грудном отделе позвоночника и контрольной группой. Они также показали, что аллель Т локуса rs2234693 (PvuII site в гене ESR1) достоверно чаще встречается во всех трех группах пациентов, и предположили, что комбинация этого полиморфизма с мутантными аллелями rs12885713 и rs5871 отягчают развитие болезни. Частота аллели Т локуса rs12885713 в восточноазиатской популяции равна 19,7%, а в европейской популяции она выше – 58,2. Частота мутантной аллели Т локуса rs5871 в восточноазиатской популяции равна 39,1%, в то время, как в европейской – 91,8%, а в южноазиатской – 87,5%. Исследований ассоциаций этих полиморфных локусов и идиопатического сколиоза на выборках пациентов европейского происхождения мы не нашли. Тем не менее эти локусы внесены в список маркеров предрасположенности к сколиозу, по крайней мере на исследовательском этапе.

Ген IL17RC (Interleukin-17 receptor C). Китайские исследователи в двух своих работах [21, 22] на выборке из 529 девочек подросткового возраста показали, что полиморфный локус rs708567, расположенный в интроне гена, статистически значимо связан с предрасположенностью к сколиозу. А именно носители аллели G имеют в 1,507 раза больше шансов развития сколиоза, чем носители аллели A, а носители генотипа GG имеют в 1,550 раза больше шансов развития болезни, чем носители генотипа AG. Кроме того, у носителей генотипа GG при развитии болезни угол Кобба больше, чем у носителей генотипа AG. В метаанализе результатов исследований, посвященных поиску генетических маркеров идиопатического сколиоза, [23] достоверность выявленной ассоциации была подтверждена. Частота мутантной аллели G в этом локусе достаточно высока во всех мегапопуляциях, хотя в восточноазиатской она самая вы-

сокая – 90,7%. Лocus rs708567 был внесен в наш список маркеров.

Ген MATN1 (Matrilin 1). Группа южнокорейских ученых [24] обнаружила статистически значимую ассоциацию полиморфного локуса rs1065755 с типом искривления позвоночника, когда сравнивала пациентов с идиопатическим сколиозом (166) и контрольную выборку (126). По их данным аллель А связан с большим риском возникновения сколиоза, чем аллель G. Также аллель А достоверно чаще встречается в группе больных с двойной кривизной позвоночника, чем в контрольной группе. Этот полиморфизм представляет собой синонимичную мутацию, то есть замену нуклеотида в третьем положении в кодоне, которая не изменяет кодируемую этим кодоном аминокислоту и, следовательно, свойства самого белка. Частота мутантной аллели G в этом локусе также высока во всех мегапопуляциях, а в восточноазиатской популяции она самая высокая – 81,7%. Лocus rs1065755 внесен в список маркеров, чтобы проверить его эффект на выборках наших пациентов.

Ген GPER1 (G protein-coupled estrogen receptor 1). Группа китайских исследователей [25] на выборке из 344 пациентов с идиопатическим подростковым сколиозом пытались выявить связь нескольких однонуклеотидных полиморфных локусов: rs3808351, rs10269151 и rs4266553, расположенных в интронах гена GPER1, с предрасположенностью к заболеванию. Четкой связи им найти не удалось, однако они установили, что гетерозиготы по всем трем локусам статистически значимо связаны со степенью кривизны позвоночника. Японская команда ученых повторила эти исследования [26] на 2117 пациентах и не нашла достоверных различий в частотах встречаемости аллелей риска у пациентов и контрольной группе. По данным проекта «1000 геномов» частота аллели G (аллель риска) локуса rs3808351 в восточноазиатской популяции – 82%, европейской – 70%, южноазиатской – 67%; частота аллели G (аллель риска) локуса rs10269151 в восточноазиатской популяции – 93%, европейской – 95%, южноазиатской – 99%; частота аллели G (аллель риска) локуса rs4266553 в восточноазиатской популяции – 7%, европейской – 11%, южноазиатской – 13%. Мы решили внести эти локусы в наш список маркеров. Частоты аллелей G (аллель риска) первых двух локусов очень высоки во всех мегапопуляциях – Азия, Европа, Африка и т.д., и учитывая результаты китайских ученых, что в группе пациентов достоверно чаще, чем в контроле, встречаются гетерозиготы по этим локусам, может

оказаться, что аллелями риска будут другие аллели.

Ген ESR2 (Estrogen Receptor 2). Китайские исследователи [27] на выборке из 218 пациентов показали, что частота генотипов CC однонуклеотидного полиморфного локуса rs1256120 в 5'-нетранслируемой области гена ESR2 достоверно выше в группе пациентов, чем в контрольной группе. На основании этого они пришли к выводу, что этот locus может быть связан с предрасположенностью к идиопатическому сколиозу. Японская группа [28] повторила эти исследования на выборке из 798 пациентов и не нашла связи локуса rs1256120 со сколиозом. Ученые из Польши [29] также не выявили связи этого локуса с предрасположенностью к сколиозу. И, наконец, группа из Канады [30] провела метаанализ всех исследований и не подтвердила связи указанного локуса с предрасположенностью к идиопатическому сколиозу. На основании всего вышеизложенного мы не стали включать locus rs1256120 в гене ESR2 в список потенциальных маркеров сколиоза. Упомянутая выше группа из Польши [29] обнаружила связь другого полиморфного локуса rs4986938 в гене ESR2 со степенью искривления позвоночника при сколиозе. Так, у пациентов с генотипом AA величина угла Кобба была $31,9^\circ \pm 14,2^\circ$; с генотипом AG – $43,2^\circ \pm 17,8^\circ$; и с генотипом GG – $38,9^\circ \pm 19,0^\circ$. Других исследований прямой связи этого локуса со сколиозом мы не обнаружили. Частота аллели G и в восточноазиатской, и в европейской популяциях достаточно высока – 87% и 62% соответственно. Мы внесли этот locus в наш список потенциальных маркеров сколиоза.

Ген MESP2 (Mesoderm posterior protein 2). Группа британских ученых [31] обнаружила редкую мутацию – дупликацию четырех нуклеотидов ACCG в первом экзоне гена MESP2, приводящую к сдвигу рамки считывания, у двух детей со спондилокардальным дизостозисом в одной семье. Они оказались гомозиготами по данной мутации, в то время как их родители с нормальным фенотипом были гетерозиготами, а третий ребенок, также с нормальным фенотипом был гомозиготой по «дикой» аллели. Данных по частоте встречаемости этого полиморфизма нет в базе проекта «1000 геномов», поэтому оценить общую частоту встречаемости патогенной аллели мы не смогли, но внесли этот locus в список потенциальных маркеров. Коллектив американских исследователей [32] изучил 12 семей из Пуэрто-Рико, в которых имелись случаи спондилоторакального дизостозиса, и выявила 10 семей с гомозиготными носи-

телями мутации rs71647808 в гене MESP2, приводящей к образованию стоп-кодона и преждевременной терминации трансляции. Все гомозиготные носители мутации были поражены заболеванием в разной степени тяжести, и у всех был сколиоз. Гетерозиготные носители этой мутации не имели внешних проявлений болезни. В том же исследовании авторы обнаружили еще две мутации в гене MESP2 – rs118204035, приводящую к стоп-кодону, и rs71647806, приводящую к замене лейцина в 125 положении на валин. Носители этих мутаций были гетерозиготами и имели нормальный фенотип. Авторы предположили по характеру распространения мутаций, что имеется эффект основателя. Данных по частотам аллелей этих полиморфных локусов в базе данных проектов «1000 геномов» и «Альфред» мы не нашли, но внесли эти локусы в наш список маркеров исключительно из научного интереса.

Ген SLC6A4 (Solute carrier family 6 member 4). Группа исследователей из США [33] проанализировала участок (18,3Mb – 31,47Mb) хромосомы 17 человека, чтобы найти определенные генетические факторы, связанные с семейным идиопатическим сколиозом. В исследовании участвовало 202 семьи (1198 человек), в каждой из которых имелось как минимум 2 человека с диагностированным сколиозом; в 17 семьях были мужчины, которые перенесли операцию по исправлению позвоночника. Наиболее достоверная связь со сколиозом была выявлена для однонуклеотидного полиморфного локуса rs4325622, находящегося в интроне гена SLC6A4. Аллель риска Т статистически значимо встречался чаще среди больных сколиозом, чем в контрольной группе. Средняя частота аллели Т в европейских популяциях 56,5%, в азиатских 17,7%. В этом же исследовании была обнаружена достоверная ассоциация полиморфного локуса rs2066713, также расположенного в интроне гена SLC6A4, со сколиозом. По данным проекта «1000 геномов» средняя частота аллели риска Т в европейских популяциях равна 38%, в азиатских – 6,5%.

Ген SSH2 (Slingshot protein phosphatase 2). Та же группа обнаружила статистически достоверную ($p > 0,05$) ассоциацию полиморфного локуса rs2467334, локализованного в интроне гена, со сколиозом. Средняя частота аллели риска С в европейской популяции равна 49,9%, а в восточноазиатской – 28,1%.

Ген BLMH (Bleomycin hydrolase). В этом исследовании была выявлена еще одна ассоциация заболевания с однонуклеотидным полиморфным локусом rs7342921, который находится в кодирующей части гена, однако

мутация не приводит к замене аминокислоты, а значит, не нарушает свойства кодируемого белка. Средняя частота аллели риска G в европейских популяциях 67,1%, в азиатских – 82,5%.

Ген RAB11FIP4 (Rab11 family interacting protein 4). Статистически достоверная ассоциация полиморфного локуса rs2074153, находящегося в интроне гена, с развитием сколиоза была обнаружена этими же авторами. Средняя частота аллели риска G в европейских популяциях равна 32,5%, в азиатских – 20,3%. Несмотря на то, что все эти ассоциации были описаны только в одном исследовании и только для одной локальной популяции, мы внесли полиморфные локусы rs4325622, rs2066713, rs2467334, rs734292, rs2074153 в список маркеров предрасположенности к сколиозу, чтобы исследовать их статус в популяции Сибири.

Ген CNTNAP2 (Contactin-associated protein 2). Группа авторов из США [34] методом прямого секвенирования провела исследование 1113 геномов из 419 семей европейского (кавказского) происхождения, в которых были случаи подросткового идиопатического сколиоза. Ученые проанализировали 326498 однонуклеотидных полиморфных локусов на наличие ассоциации их со сколиозом и обнаружили статистически достоверную связь локуса rs11770843, находящегося в интроне гена CNTNAP2 с подростковым идиопатическим сколиозом. Группа исследователей из Китая [35] проанализировала выборку пациентов из китайской популяции и не нашла связи между полиморфизмом rs11770843 гена CNTNAP2 и подростковым идиопатическим сколиозом. Как в экспериментальной (N = 100), так и в контрольной группе (N = 100) у всех обследованных был генотип T/T. В базе данных NCBI (National Center for Biotechnology Information) для этого локуса указана замена С на Т (C>T), что подразумевает аллель С, как предковый или «дикий» вариант. Однако на веб-странице этого полиморфизма предковым вариантом уже указана аллель Т. Учитывая среднюю частоту аллели Т в европейских популяциях равной 74%, а в азиатских – 99,3%, предковым вариантом является, скорее, аллель Т, а аллелью риска – С. Тогда результат, полученный китайской группой, объясним, их выборка была мономорфна по этому маркеру. Принимая во внимание результаты американских ученых и частоты аллелей локуса rs11770843 в европейской популяции, мы включили этот локус в список потенциальных маркеров сколиоза.

Ген ZNF618 (Zinc Finger Protein 618). Упомянутая выше американская группа обнаружила достоверную ассоциацию

подросткового идиопатического сколиоза с районом хромосомы 9, лежащем в интервале 9q31.2-34.2. В этом районе были выделены несколько однонуклеотидных полиморфных локусов, один из которых – локус rs4979321, находящийся в интроне гена ZNF618, показал хотя и скромную, но статистически значимую связь с заболеванием.

Ген AMBP (Alpha-1-Microglobulin/Bikunin Precursor). Следующим полиморфным локусом из этого района был rs891725, лежащий в интроне гена AMBP. Для него также была показана статистически значимая связь со сколиозом.

Ген PALM2 (Paralemmin-2). Полиморфный локус rs1969944 из интрона гена PALM2 также показал статистически значимую ассоциацию с идиопатическим сколиозом, как и локус rs4836643, находящийся в том же районе в межгенном промежутке в позиции 9:129197852. По упомянутым выше причинам мы внесли локусы rs4979321, rs891725, rs1969944, rs4836643 в наш список потенциальных маркеров предрасположенности к сколиозу. В этом же исследовании были найдены еще четыре полиморфных локуса, строго ассоциированных с подростковым идиопатическим сколиозом. Эти же авторы провели дополнительное статистическое исследование полученных результатов [35]. Два из этих локусов: rs1400180 и rs10510181, находящиеся в интронах гена LOC101927174 (не охарактеризованный ген с хромосомы 3). И два других: rs1040315 и rs2222973 из интронов гена DSCAM (Down syndrome cell adhesion molecule) с хромосомы 21. Доказательства достоверности ассоциаций локусов со сколиозом, приведенные авторами, и частоты аллелей риска в азиатской и европейской популяциях дали нам основание внести эти полиморфные локусы в список маркеров предрасположенности к сколиозу.

Ген LEPR (Leptin receptor). Коллектив исследователей из Китая [36] проанализировал связь шести полиморфных локусов из гена LEPR у 570 пациентов в возрасте от 10 до 18 лет с подростковым идиопатическим сколиозом и 570 здоровых контролей соответствующего пола и возраста. Для rs2767485 из этих шести локусов была выявлена существенная разница в частотах аллелей и генотипов в экспериментальной и контрольной группах. Средняя частота встречаемости аллели риска С в европейской популяции 16,2%, в азиатской 5,7%. Хотя, эта ассоциация выявлена только в одном исследовании, мы добавили локус rs2767485 в список маркеров предрасположенности к сколиозу.

Гены BCL-2 (B-cell lymphoma 2), межгенный промежуток между PAX3 (Paired

box 3) и EPNA4 (Ephrin receptor A4), возле AJAP1 (Adherens Junctions Associated Protein 1). Китайские ученые [10] сделали анализ геномов 4317 пациентов женского пола из китайской популяции с диагностированным подростковым идиопатическим сколиозом, у которых угол кривизны позвоночника (угол Кобба) был более 20°. В трех репликативных исследованиях они обнаружили достоверную связь с заболеванием следующих полиморфизмов: rs4940576 (интрон гена BCL-2), средняя частота аллели риска Т в европейской популяции 23,3%, в азиатской – 46,9%; rs13398147 (между PAX3 и EPNA4), средняя частота аллели риска Т в европейской популяции 21,9%, в азиатской – 23,4%; rs241215 (возле AJAP1) средняя частота аллели риска А в европейской популяции 57,2%, в азиатской – 27,7%. Мы внесли полиморфные локусы rs4940576, rs13398147 и rs241215 в список маркеров предрасположенности к сколиозу.

Ген BNC2 (Basonuclin-2). Группа авторов из Японии [37] исследовала геномы 2109 пациентов с диагностированным сколиозом из японской популяции и геномы 11140 человек в качестве контроля. Они определили регион 9p22.2 на хромосоме 9, который связан с риском возникновения подросткового идиопатического сколиоза. В этом локусе находится ген BNC2, а в его интроне были определены несколько полиморфных локусов, которые статистически достоверно связаны с проявлениями сколиоза: rs3904778 (аллель G повышает риск), средняя частота аллели G в европейской популяции 22,9%, в азиатской популяции 66,2%; rs3850444 (аллель G повышает риск), средняя частота аллели G в европейской популяции 22,9%, в азиатской популяции 66,3%; rs2383002 (аллель С повышает риск), средняя частота аллели С в европейской популяции 22,96%, в азиатской популяции 66,87%; rs10738445 (аллель А повышает риск), средняя частота аллели А в европейской популяции 21,5%, в азиатской популяции 63,8%. Авторы повторили свое исследование на репрезентативной выборке пациентов и контролей из китайской популяции, и получили аналогичные результаты. Исследований описанных ассоциаций на выборках из европейской популяции мы не обнаружили, тем не менее мы добавили полиморфные локусы rs3904778, rs3850444, rs2383002 и rs10738445 в список потенциальных маркеров предрасположенности к сколиозу.

Группа исследователей из Китая [38] проанализировала образцы ДНК 990 пациентов женского пола с подростковым идиопатическим сколиозом и 1188 человек в кон-

трольной группе из китайской популяции. В сравнении с контролем у пациентов со сколиозом частота аллели G полиморфного локуса rs12618119, находящегося в межгенном промежутке в позиции 2:126742262, была достоверно выше. Частота этой аллели в восточноазиатской популяции составляет 46,8%, в европейской – 33,5%. Публикаций с подобными исследованиями на выборках пациентов со сколиозом из европейской популяции мы не обнаружили, однако, включили этот локус в число потенциальных маркеров предрасположенности к сколиозу.

Гены LINC01478 (Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 1478), SPATA21 (Spermatogenesis-Associated Protein 21), и CDH13 (Cadherin 13). В том же исследовании авторы показали, что частота аллели A полиморфного локуса rs9945359 гене LINC01478 была значительно выше в группе пациентов, чем в контрольной группе. Кроме этого, было обнаружено, что в группе пациентов со сколиозом частота аллели T полиморфного локуса rs4661748 в гене SPATA21 и аллели C полиморфного локуса rs4782809 в гене CDH13 достоверно ниже, чем в контрольной группе. Средняя частота аллели A полиморфного локуса rs9945359 (LINC01478) в европейской популяции 15,5%, в азиатской – 19,6%. Средняя частота аллели T полиморфного локуса rs4661748 (SPATA21) в европейской популяции 31%, в азиатской популяции – 16%. Средняя частота аллели G полиморфизма rs4782809 (CDH13) в европейской популяции 44,6%, в азиатской – 46,9%. В этом исследовании авторы проверяли пригодность для китайской популяции маркеров тяжести протекания сколиоза, отобранных по итогам обследования североамериканцев европейского происхождения. Из 53 маркеров только перечисленные показали достоверные различия в частотах аллелей в группе пациентов и контрольной группе. Мы внесли полиморфизмы rs12618119, rs9945359, rs4661748, rs4782809 в список маркеров предрасположенности к сколиозу.

Ген MMP9 (Matrix metalloproteinase 9) Китайские ученые [39] изучили группу женщин с диагностированным сколиозом из китайской популяции (N = 190) в сравнении с контрольной группой (N = 190). Исследование показало, что у пациентов с генотипом GG полиморфного локуса rs2250889 гена MMP9 больший максимальный угол Кобба, чем у носителей генотипа CG или CC. Средняя встречаемость аллели G полиморфизма rs2250889 в европейской популяции 4,6%, в азиатской – 22,8%. Это единственная публикация, в которой описана такая зависимость, однако мы добавили

локус rs2250889 в список маркеров предрасположенности к сколиозу.

Ген HSPG2 (Heparan Sulfate Proteoglycan 2). Группа авторов из США [40] исследовала генотипы группы пациентов из европейской популяции и обнаружила несколько потенциально патогенных полиморфных локусов, связанных с идиопатическим сколиозом. Наиболее значимая ассоциация с заболеванием была обнаружена у полиморфного локуса rs143736974 в гене HSPG2. Средняя частота аллели дикого типа T полиморфного локуса rs143736974 в европейской популяции равна 99,6%, в азиатской – 100%. Несмотря на такую низкую частоту мутантной аллели C и единственную публикацию, описывающую ассоциацию локуса со сколиозом, мы добавили локус rs143736974 в список маркеров предрасположенности к сколиозу, по крайней мере на исследовательский период.

Таким образом, в предыдущем [2] и настоящем обзорах были проанализированы 80 генетических маркеров, для которых (на основе анализа данных литературы) была показана статистически достоверная связь с проявлениями сколиоза. Для некоторых из этих маркеров показана связь не только с риском возникновения самого заболевания, но и с его прогрессом. Проведенный анализ показал, что практически все эти полиморфные локусы являются в чистом виде маркерами, а не причинами развития идиопатического сколиоза. За исключением полиморфных локусов rs4753426, rs11063714, rs8179090, rs1800469, rs3025058, rs1800795, rs1800796, и rs5742612, находящихся в регуляторных районах генов, а именно в промоторах, остальные находятся либо в интронах, либо в межгенных промежутках. Только локус rs2289292 находится в экзоне гена TBX6, но замена нуклеотида в третьем положении не меняет аминокислоту, которую кодирует триплет, а значит, такая мутация не изменяет свойств белка. Из полиморфных локусов, находящихся в промоторах, только для rs3025058 показано, что его мутантный вариант 6T снижает экспрессию гена MMP3. Для локуса rs7755109, который находится в интроне гена GPR126, была показана строгая связь мутантной аллели G этого локуса с пониженными уровнями матричной РНК гена GPR126 и кодируемого им белка, хотя механизмов влияния этой мутации на альтернативный сплайсинг матричной РНК гена не выявлено. Так же в гене MESP2 выявлены несколько мутаций – rs71647808, rs118204035, rs71647806, приводящих к сдвигу рамки считывания, преждевременной терминации, или замене аминокислоты. MESP2 является членом ос-

новного семейства (bHLH – helix-loop-helix) транскрипционных регуляторных белков, необходимых для широкого спектра процессов внутриутробного развития, и имеет решающее значение для нормального сомитогенеза у человека. Это, пожалуй, единственный ген из нашего списка, для которого описаны мутации, изменяющие структуру белка, потенциально влияющего на возникновение сколиоза, однако эти мутации обнаружены в очень ограниченной популяции.

Все проанализированные полиморфные локусы только маркируют само заболевание или особенности его протекания, и ни для одного из них не было показано, что мутация в этом локусе является причиной заболевания идиопатическим сколиозом.

В анализ было вовлечено 53 гена и района хромосом, если локусы располагались в межгенных промежутках. Практически все эти гены никак не связаны с развитием или функционированием соединительной ткани, а некоторые из них даже косвенно не вовлечены в генные каскады, обеспечивающие метаболизм соединительных тканей. Каким образом формируются выявленные ассоциации полиморфных локусов с заболеванием сколиозом, на сегодняшний день никто ответить не может. Не было выявлено ни одного основного гена, мутации в котором наверняка приводят к развитию болезни, и авторы большинства приведенных публикаций пишут, что сколиоз является полигенным заболеванием, для которого список генов не определен. Тем не менее из большого списка маркеров, для которых пытались выявить ассоциацию с заболеванием, для анализа были выбраны 80 маркеров, один из которых не был внесен в наш список потенциальных маркеров сколиоза для создания прогностической тест-системы, определяющей риски возникновения заболевания или особенности его протекания.

Частоты аллелей упомянутых полиморфных локусов в популяциях Европы, Азии, Африки, Америк, приведенные в базах данных проекта «1000 геномов», достаточно сильно различаются. Причин этому может быть несколько, от «эффекта основателя» до отбора против одного из аллельных вариантов. Анализ частот встречаемости аллелей показал, что все перечисленные в приведенном обзоре полиморфные локусы являются маркерами сколиоза, а не его причиной. Например, аллель G в локусе rs1800795, находящемся в промоторе гена IL-6, достоверно чаще встречается в итальянской выборке больных идиопатическим сколиозом, при его частоте в европейской популяции 58,5%, и для него же не было

показано какой-либо связи с заболеванием в китайской выборке, поскольку и группа пациентов, и группа контроля имели 100% частоту аллели G, при том, что частота встречаемости сколиоза среди китайцев не выше, чем в других макропопуляциях, как Азии, так и Европы с Америкой. Аналогичная ситуация случается и с некоторыми другими локусами, частоты аллелей риска которых достигают 80–90 и более процентов. Понятно, что если бы мы разрабатывали тест-систему для китайцев, то этот маркер был бы исключен из списка. Вопрос, что считать аллелью риска в той или иной популяции, очень часто вставал при анализе данных проекта «1000 геномов», потому что частоты аллелей риска многих локусов превышали 70–80%. Это означает, что большинство особей в популяции являются носителями таких аллелей и должны страдать сколиозом. Это, разумеется, не так, хотя при исследованиях в группах пациентов со сколиозом частоты этих аллелей были достоверно выше, чем в контрольных группах.

При привлечении проекта «1000 геномов» в настоящий анализ нас интересовала возможность использовать этот пул данных в качестве «контрольной группы» при популяционных исследованиях, поскольку было заявлено, что в выборку проекта попали участники без видимых внешних признаков каких-либо заболеваний и которые заявили о себе, что они здоровы. Но при анализе данных по частотам аллелей полиморфных локусов, связанных с проявлением сколиоза, стало очевидным, что использовать их в качестве контроля некорректно. Поэтому, в дальнейших исследованиях с помощью создаваемого ДНК-микрочипа будут формироваться адекватные контрольные группы.

Для каждой локальной популяции характерны свои частоты встречаемости аллелей конкретных однонуклеотидных полиморфных локусов, и эти частоты могут сильно отличаться от соседних популяций. Как пример, по нескольким локусам была статистически достоверно показана их связь со сколиозом в китайской популяции, однако в японской популяции такой связи выявлено не было. Поэтому, исследуя выборку пациентов из Китая, некорректно было бы сравнивать частоты аллелей в ней с частотами, обобщенными для всей восточноазиатской популяции.

Население Сибирского федерального округа Российской Федерации характеризуется неоднородностью своего состава в первую очередь из-за различного происхождения популяций, составляющих это население. Наряду с автохтонными наро-

дами, в основном восточноазиатского и североазиатского происхождения, такими как тувинцы, хакасы, буряты, ханты, якуты, Сибирь населяют многочисленные выходцы славянского происхождения из южной, центральной и северной частей России, активно переселявшиеся сюда в последние 100–150 лет. Кроме этого, в сибирском регионе длительное время (300 и более лет) проживают достаточно закрытые локальные популяции русских, происходящие от ограниченного числа родоначальников.

В последние десятилетия в Сибирь мигрировали значительные количества выходцев из Центральной Азии, Китая, Кавказа и Западных регионов России и Украины. На территории Сибири сложилась своего рода уникальная ситуация из-за смешивания разных рас и народов. Это также накладывает ограничения на использование данных по частотам аллелей из проекта «1000 геномов» в качестве группы сравнения при исследовании геномов пациентов из сибирского региона.

Составленный список потенциальных маркеров сколиоза будет использован для создания тест-системы на основе микрочиповой технологии. По результатам испытаний ДНК-микрочипа какие-то маркеры из этого списка вполне возможно будут исключены, а какие-то добавлены. Создаваемый нами ДНК-микрочип будет использован не только для исследовательских целей, но и как инструмент для анализа геномов с целью выявления маркеров, ассоциированных с идиопатическим сколиозом для расчета рисков возникновения заболевания и выбора стратегии лечения.

Список литературы

1. Кузнецов С.Б., Михайловский М.В., Садовой М.А., и др. Генетические маркеры идиопатического и врожденного сколиозов и диагноз предрасположенности к заболеванию // Хирургия позвоночника. 2015. Т. 12. № 1. С. 27–35.
2. Кузнецов С.Б., Михайловский М.В. Анализ генетических маркеров и обоснование их использования в определении предрасположенности к идиопатическому сколиозу (Обзор литературы) // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2016. № 10–4. С. 554–561.
3. Mao S., Xu L., Zhu Z., Qian B., Qiao J., Yi L., Qiu Y. Association between genetic determinants of peak height velocity during puberty and predisposition to adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2013 May 20; 38(12):1034–9. DOI: 10.1097/BRS.0b013e318287fefd.
4. Jianhua Zhao, Mingyao Li, Jonathan P Bradfield, Zhang H., Mentch F.D., Wang K., Sleiman P.M., Kim C.E., Glessner J.T., Hou C., Keating B.J., Thomas K.A., Garris M.L., Deliard S., Frackelton E.C., Otieno F.G., Chiavacci R.M., Berkowitz R.I., Hakonarson H., Grant S.F. The role of height-associated loci identified in genome wide association studies in the determination of pediatric stature. *BMC Med Genet*. 2010; 11: 96. Published online 2010 Jun 14. DOI: 10.1186/1471-2350-11-96.
5. Lanktree, Yiran Guo, Muhammed Murtaza, Glessner J.T., Bailey S.D., Onland-Moret N.C., Lettre G., Ongen H., Rajagopalan R., Johnson T., Shen H., Nelson C.P., Klopp N., Baumert J., Padmanabhan S., Pankratz N., Pankow J.S., Shah S., Taylor K.,

Barnard J., Peters B.J., Maloney C.M., Lohmeyer M.T., Stanton A., Zafarmand M.H., Romaine S.P., Mehta A., van Iperen E.P., Gong Y., Price T.S., Smith E.N., Kim C.E., Li Y.R., Asselbergs F.W., Atwood L.D., Bailey K.M., Bhatt D., Bauer J., Behr E.R., Bhangale T., Boer J.M., Boehm B.O., Bradfield J.P., Brown M., Braund P.S., Burton P.R., Carty C., Chandrupatla H.R., Chen W., Connell J., Dalgeorgou C., Boer Ad., Drenos F., Elbers C.C., Fang J.C., Fox C.S., Frackelton E.C., Fuchs B., Furlong C.E., Gibson Q., Gieger C., Goel A., Grobbee D.E., Hastie C., Howard P.J., Huang G.H., Johnson W.C., Li Q., Kleber M.E., Klein B.E., Klein R., Kooperberg C., Ky B., Lacroix A., Lanken P., Lathrop M., Li M., Marshall V., Melander O., Mentch F.D., Meyer N.J., Monda K.L., Montpetit A., Murugesan G., Nakayama K., Nondahl D., Onipinla A., Rafelt S., Newhouse S.J., Otieno F.G., Patel S.R., Putt M.E., Rodriguez S., Safa R.N., Sawyer D.B., Schreiner P.J., Simpson C., Sivapalaratnam S., Srinivasan S.R., Suver C., Swergold G., Sweitzer N.K., Thomas K.A., Thorand B., Timpson N.J., Tischfield S., Tobin M., Tomaszewski M., Verschuren W.M., Wallace C., Winkelmann B., Zhang H., Zheng D., Zhang L., Zmuda J.M., Clarke R., Balmford A.J., Danesh J., Day I.N., Schork N.J., de Bakker P.I., Delles C., Duggan D., Hingorani A.D., Hirschhorn J.N., Hofker M.H., Humphries S.E., Kivimaki M., Lawlor D.A., Kottke-Marchant K., Mega J.L., Mitchell B.D., Morrow D.A., Palmen J., Redline S., Shields D.C., Shuldiner A.R., Sleiman P.M., Smith G.D., Farrall M., Jamshidi Y., Christiani D.C., Casas J.P., Hall A.S., Doevendans P.A., Christie J.D., Berenson G.S., Murray S.S., Illig T., Dorn G.W 2nd., Cappola T.P., Boerwinkle E., Sever P., Rader D.J., Reilly M.P., Caulfield M., Talmud P.J., Topol E., Engert J.C., Wang K., Dominiczak A., Hamsten A., Curtis S.P., Silverstein R.L., Lange L.A., Sabatien M.S., Trip M., Saleheen D., Peden J.F., Cruickshanks K.J., März W., O'Connell J.R., Klungel O.H., Wijmenga C., Maitland-van der Zee A.H., Schadt E.E., Johnson J.A., Jarvik G.P., Papanicolaou G.J.; Hugh Watkins on behalf of PROCARDIS, Grant S.F., Munroe P.B., North K.E., Samani N.J., Koenig W., Gaunt T.R., Anand S.S., van der Schouw Y.T.; Meena Kumari on behalf of the Whitehall II Study and the WHII 50K Group, Soranzo N., Fitzgerald G.A., Reiner A., Hegele R.A., Hakonarson H., Keating B.J. Meta-analysis of Dense Genecentric Association Studies Reveals Common and Uncommon Variants Associated with Height. *Am J Hum Genet*. 2011 Jan 7; 88(1): 6–18. DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.11.007.

6. Shu-Feng Lei, Tie-Lin Yang, Li-Jun Tan, Chen X.D., Guo Y., Guo Y.F., Zhang L., Liu X.G., Yan H., Pan F., Zhang Z.X., Peng Y.M., Zhou Q., He L.N., Zhu X.Z., Cheng J., Liu Y.Z., Papasian C.J., Deng H.W. Genome-wide association scan for stature in Chinese: evidence for ethnic specific loci. *Hum Genet*. 2009 Feb; 125(1): 1–9. Published online 2008 Nov 23. DOI: 10.1007/s00439-008-0590-9.

7. Gao W., Peng Y., Liang G., Liang A., Ye W., Zhang L., Sharma S., Su P., Huang D. Association between common variants near LBX1 and adolescent idiopathic scoliosis replicated in the Chinese Han population. *PLoS One*. 2013;8(1):e53234. DOI: 10.1371/journal.pone.0053234.

8. Atsushi Miyake, Ikuyo Kou, Yohei Takahashi, Johnson T.A., Ogura Y., Dai J., Qiu X., Takahashi A., Jiang H., Yan H., Kono K., Kawakami N., Uno K., Ito M., Minami S., Yanagida H., Taneichi H., Hosono N., Tsuji T., Suzuki T., Sudo H., Kotani T., Yonezawa I., Kubo M., Tsunoda T., Watanabe K., Chiba K., Toyama Y., Qiu Y., Matsumoto M., Ikegawa S. Identification of a Susceptibility Locus for Severe Adolescent Idiopathic Scoliosis on Chromosome 17q24.3. *PLoS One*. 2013; 8(9): e72802. Published online 2013 Sep 4. DOI: 10.1371/journal.pone.0072802.

9. Cao Y., Min J., Zhang Q., Li H., Li H. Associations of LBX1 gene and adolescent idiopathic scoliosis susceptibility: a meta-analysis based on 34,626 subjects. *BMC Musculoskelet Disord*. 2016 Jul 22;17:309. DOI: 10.1186/s12891-016-1139-z.

10. Zhu Z., Tang N.L., Xu L., Qin X., Mao S., Song Y., Liu L., Li F., Liu P., Yi L., Chang J., Jiang L., Ng B.K., Shi B., Zhang W., Qiao J., Sun X., Qiu X., Wang Z., Wang F., Xie D., Chen L., Chen Z., Jin M., Han X., Hu Z., Zhang Z., Liu Z., Zhu F., Qian B.P., Yu Y., Wang B., Lee K.M., Lee W.Y., Lam T.P., Qiu Y., Cheng J.C. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for adolescent idiopathic scoliosis in Chinese girls. *Nat Commun*. 2015 Sep 22;6:8355. DOI: 10.1038/ncomms9355.

11. Grauers A., Wang J., Einarisdottir E., Simony A., Danielsson A., Akesson K., Ohlin A., Halldin K., Grabowski P., Tenne M., Laivuori H., Dahlman I., Andersen M., Christensen S.B., Karlsson M.K., Jiao H., Kere J., Gerdhem P. Candi-

- date gene analysis and exome sequencing confirm LBX1 as a susceptibility gene for idiopathic scoliosis. *Spine J*. 2015 Oct 1;15(10):2239-46. DOI: 10.1016/j.spinee.2015.05.013.
12. Takahashi Y., Kou I., Takahashi A., Johnson T.A., Kono K., Kawakami N., Uno K., Ito M., Minami S., Yanagida H., Taneichi H., Tsuji T., Suzuki T., Sudo H., Kotani T., Watanabe K., Chiba K., Hosono N., Kamatani N., Tsunoda T., Toyama Y., Kubo M., Matsumoto M., Ikegawa S. A genome-wide association study identifies common variants near LBX1 associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Nat Genet*. 2011 Oct 23; 43(12):1237-40. DOI: 10.1038/ng.974.
13. Chen S., Zhao L., Roffey D.M., Phan P., Wai E.K. Association of rs1190870 near LBX1 with adolescent idiopathic scoliosis in East Asians: a systematic review and meta-analysis. *Spine J*. 2014 Dec 1;14(12):2968-75. DOI: 10.1016/j.spinee.2014.05.019.
14. Chettier R., Nelson L., Ogilvie J.W., Albertsen H.M., Ward K. Haplotypes at LBX1 have distinct inheritance patterns with opposite effects in adolescent idiopathic scoliosis. *PLoS One*. 2015 Feb 12; 10(2):e0117708. DOI: 10.1371/journal.pone.0117708. eCollection 2015.
15. Kristen Fay Gorman, Cédric Julien, and Alain Moreau. The genetic epidemiology of idiopathic scoliosis. *Eur Spine J*. 2012 Oct; 21(10): 1905–1919. Published online 2012 Jun 14. DOI: 10.1007/s00586-012-2389-6.
16. Yu Zhang, Zuchao Gu, and Guixing Qiu. The Association Study of Calmodulin 1 Gene Polymorphisms with Susceptibility to Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 168106. Published online 2014 Jan 16. DOI: 10.1155/2014/168106.
17. Rajasekaran S., Kanna R.M., Senthil N., Raveendran M., Ranjani V., Cheung K.M., Chan D., Kao P.Y., Yee A., Shetty A.P. Genetic susceptibility of lumbar degenerative disc disease in young Indian adults. *Eur Spine J*. 2015 Sep;24(9):1969-75. DOI: 10.1007/s00586-014-3687-y.
18. Zhao D., Qiu G.X., Wang Y.P., Zhang J.G., Shen J.X., Wu Z.H. Association between adolescent idiopathic scoliosis with double curve and polymorphisms of calmodulin 1 gene/estrogen receptor- α gene. *Orthop Surg*. 2009 Aug;1(3):222-30. DOI: 10.1111/j.1757-7861.2009.00038.x.
19. Zhao D., Qiu G.X., Wang Y.P., Zhang J.G., Shen J.X., Wu Z.H., Wang H. Association of calmodulin1 gene polymorphisms with susceptibility to adolescent idiopathic scoliosis. *Orthop Surg*. 2009 Feb;1(1):58-65. DOI: 10.1111/j.1757-7861.2008.00011.x.
20. Zhao D., Qiu G.X., Wang Y.P. Is calmodulin 1 gene/estrogen receptor-alpha gene polymorphisms correlated with double curve pattern of adolescent idiopathic scoliosis? *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2008 Sep 16;88(35):2452-6.
21. Zhou S., Qiu X.S., Zhu Z.Z., Wu W.F., Liu Z., Qiu Y. A single-nucleotide polymorphism rs708567 in the IL-17RC gene is associated with a susceptibility to and the curve severity of adolescent idiopathic scoliosis in a Chinese Han population: a case-control study. *BMC Musculoskelet Disord*. 2012 Sep 21;13:181. DOI: 10.1186/1471-2474-13-181.
22. Zhou S., Zhu Z., Qiu X., Wu W., Wang W., Liu Z., Lv F., Qiu Y. Association study of IL17RC, CHL1, DSCAM and CNTNAP2 genes polymorphisms with adolescent idiopathic scoliosis susceptibility in a Chinese Han population. *Stud Health Technol Inform*. 2012;176:47-51.
23. Andriy Noshchenko, Lilian Hoffecker, Emily M. Lindley, Burger E.L., Cain C.M., Patel V.V., Bradford A.P. Predictors of spine deformity progression in adolescent idiopathic scoliosis: A systematic review with meta-analysis. *World J Orthop*. 2015 Aug 18; 6(7): 537–558. Published online 2015 Aug 18. DOI: 10.5312/wjo.v6.i7.537.
24. Bae J.W., Cho C.H., Min W.K., Kim U.K. Associations between matrilin-1 gene polymorphisms and adolescent idiopathic scoliosis curve patterns in a Korean population. *Mol Biol Rep*. 2012 May; 39(5):5561-7. DOI: 10.1007/s11033-011-1360-7.
25. Peng Y., Liang G., Pei Y., Ye W., Liang A., Su P. Genomic polymorphisms of G-protein estrogen receptor 1 are associated with severity of adolescent idiopathic scoliosis. *Int Orthop*. 2012 Mar;36(3):671-7. DOI: 10.1007/s00264-011-1374-8.
26. Ogura Y., Takahashi Y., Kou I., Nakajima M., Kono K., Kawakami N., Uno K., Ito M., Minami S., Yanagida H., Taneichi H., Yonezawa I., Tsuji T., Suzuki T., Sudo H., Kotani T., Watanabe K., Chiba K., Toyama Y., Matsumoto M., Ikegawa S. A replication study for association of 5 single nucleotide polymorphisms with curve progression of adolescent idiopathic scoliosis in Japanese patients. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2013 Apr 1;38(7):571-5. DOI: 10.1097/BRS.0b013e3182761535.
27. Zhang H.Q., Lu S.J., Tang M.X., Chen L.Q., Liu S.H., Guo C.F., Wang X.Y., Chen J., Xie L. Association of estrogen receptor beta gene polymorphisms with susceptibility to adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009 Apr 15;34(8):760-4. DOI: 10.1097/BRS.0b013e31818ad5ac.
28. Takahashi Y., Matsumoto M., Karasugi T., Watanabe K., Chiba K., Kawakami N., Tsuji T., Uno K., Suzuki T., Ito M., Sudo H., Minami S., Kotani T., Kono K., Yanagida H., Taneichi H., Takahashi A., Toyama Y., Ikegawa S. Replication study of the association between adolescent idiopathic scoliosis and two estrogen receptor genes. *J Orthop Res*. 2011 Jun; 29(6):834-7. DOI: 10.1002/jor.21322. Epub 2010 Dec 23.
29. Kotwicki T., Janusz P., Andrusiewicz M., Chmielewska M., Kotwicka M. Estrogen receptor 2 gene polymorphism in idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2014 Dec 15;39(26):E1599-607. DOI: 10.1097/BRS.0000000000000643.
30. Zhao L., Roffey D.M., Chen S. Association between the Estrogen Receptor Beta (ESR2) Rs1256120 Single Nucleotide Polymorphism and Adolescent Idiopathic Scoliosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2016 Oct 17. [Epub ahead of print].
31. Whittock N.V., Sparrow D.B., Wouters M.A., Silence D., Ellard S., Dunwoodie S.L., Turnpenny P.D. Mutated MESP2 causes spondylocostal dysostosis in humans. *Am J Hum Genet*. 2004 Jun;74(6):1249-54. Epub 2004 Apr 30.
32. Cornier A.S., Staehling-Hampton K., Delventhal K.M., Saga Y., Caubet J.F., Sasaki N., Ellard S., Young E., Ramirez N., Carlo S.E., Torres J., Emans J.B., Turnpenny P.D., Pourquie O. Mutations in the MESP2 gene cause spondylocostal dysostosis/Jarcho-Levin syndrome. *Am J Hum Genet*. 2008 Jun;82(6):1334-41. DOI: 10.1016/j.ajhg.2008.04.014.
33. Clough M., Justice C.M., Marosy B., Miller N.H. Males with familial idiopathic scoliosis: a distinct phenotypic subgroup. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2010 Jan 15;35(2):162-8. DOI: 10.1097/BRS.0b013e3181b7f1a7.
34. Swarkar Sharma, Xiaochong Gao, Douglas Londono, Devroy S.E., Mauldin K.N., Frankel J.T., Brandon J.M., Zhang D., Li Q.Z., Dobbs M.B., Gurnett C.A., Grant S.F., Hakonarson H., Dormans J.P., Herring J.A., Gordon D., Wise C.A. Genome-wide association studies of adolescent idiopathic scoliosis suggest candidate susceptibility genes. *Hum. Mol. Genet*. (2011) 20 (7): 1456-1466. DOI: 10.1093/hmg/ddq571.
35. Wu W., Zhu Z., Mao S., Qiu X., Qian B., Liu Z., Qiu Y. Lack of association between DSCAM gene polymorphisms and adolescent idiopathic scoliosis susceptibility in a Chinese Han population. *J Back Musculoskelet Rehabil*. 2015;28(4):681-7. DOI: 10.3233/BMR-140567.
36. Liu Z., Wang F., Xu L.L., Sha S.F., Zhang W., Qiao J., Bao H.D., Qiu Y., Jiang Q., Zhu Z.Z. Polymorphism of rs2767485 in Leptin Receptor Gene is Associated with the Occurrence of Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2015 Oct 15;40(20):1593-8. DOI: 10.1097/BRS.0000000000001095.
37. Ogura Y., Kou I., Miura S., Takahashi A., Xu L., Takekida K., Takahashi Y., Kono K., Kawakami N., Uno K., Ito M., Minami S., Yonezawa I., Yanagida H., Taneichi H., Zhu Z., Tsuji T., Suzuki T., Sudo H., Kotani T., Watanabe K., Hosogane N., Okada E., Iida A., Nakajima M., Sudo A., Chiba K., Hiraki Y., Toyama Y., Qiu Y., Shukunami C., Kamatani Y., Kubo M., Matsumoto M., Ikegawa S. A Functional SNP in BNC2 Is Associated with Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Am J Hum Genet*. 2015 Aug 6;97(2):337-42. DOI: 10.1016/j.ajhg.2015.06.012. Epub 2015 Jul 23.
38. Xu L., Huang S., Qin X., Mao S., Qiao J., Qian B.P., Qiu Y., Zhu Z. Investigation of the 53 Markers in a DNA-Based Prognostic Test Revealing New Predisposition Genes for Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2015 Jul 15;40(14):1086-91. DOI: 10.1097/BRS.0000000000000900.
39. Huang D.S., Liang G.Y., Su P.Q. Association of matrix metalloproteinase 9 polymorphisms with adolescent idiopathic scoliosis in Chinese Han female. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2011 Oct;28(5):532-5. DOI: 10.3760/cma.j.isn.1003-9406.2011.05.013.
40. Erin E. Baschal, Cambria I. Wethey, Kandice Swindle, Baschal R.M., Gowan K., Tang N.L., Alvarado D.M., Haller G.E., Dobbs M.B., Taylor M.R., Gurnett C.A., Jones K.L., Miller N.H. Exome Sequencing Identifies a Rare HSPG2 Variant Associated with Familial Idiopathic Scoliosis. *G3 (Bethesda)*. 2015 Feb; 5(2): 167–174. Published online 2014 Dec 12. DOI: 10.1534/g3.114.015669.