

Настоящее изобретение относится к методу диагностики шизофрении. Более конкретно, оно относится к способу определения изменений в одной из повторяющихся последовательностей ДНК, находящейся в гене тирозингидроксилазы (ТН), некоторые формы которых специфически появляются у пациентов, больных шизофренией. Изобретение также относится к праймерам, используемым для определения специфических аллелей этой повторяющейся последовательности, связанных с шизофренией.

Наличие мутаций во всех классах повторяющихся последовательностей ДНК представляет собой известное явление. Однако функциональное значение этих мутаций является неопределенным. Так, микросателлиты представляют собой многочисленный класс повторяющихся последовательностей ДНК, которые обладают высоким полиморфизмом, связанным с изменениями в числе повторяющихся звеньев (ссылка 1) и/или в последовательности этих звеньев. По этой причине эти микросателлиты используют в качестве генетических маркеров для конструирования генетических карт и для идентификации локусов, принимающих участие в патологиях (ссылка 2). Величина различных аллелей микросателлита зависит от изменений в числе повторяющихся звеньев. Эксперименты по секвенированию повторяющихся димеров таким образом позволяют показать изменение в числе повторяющихся звеньев и в их последовательности. Эти изменения могут, в частности, соответствовать "полным" повторениям, то есть без прерывания последовательности оснований, или "неполным" повторениям, включающим одно или несколько прерываний в последовательностях звеньев, когда речь идет о делециях (делециях) или инсерциях (инсерциях) (ссылка 3). Таким же образом в повторяющихся гетеродимерных или тетрамерных звеньях наблюдают изменения длины и/или последовательности. Так, изменения этого типа наблюдают в микросателлитах HUMHPRTB (ссылка 4) и HUMTHO1 (ссылка 5).

Более конкретно, заявитель занимался поиском генетических изменений, связанных с шизофренией. С этой целью заявитель исследовал связь между геном тирозингидроксилазы (ТН) и шизофренией, ориентируясь преимущественно на микросателлит HUMTHO1. ТН представляет собой фермент, ограничивающий способ биосинтеза катехоламинов. Были проведены различные генетические исследования психических и неврологических патологий при использовании маркеров, локализованных в гене ТН (ссылки 6 и 7). Однако вплоть до настоящего времени в литературе нет никаких сведений о генетической ассоциации с шизофренией.

Микросателлит HUMTHO1 локализован в первом интроне гена тирозингидроксилазы. Этот микросателлит образован повторяющимися тетрамерными звеньями TCAT. Он обладает

некоторым полиморфизмом, причем описаны различные аллели, имеющие изменяемые количества повторяющихся звеньев. Наиболее часто встречающийся аллель включает 10 повторяющихся звеньев и делецию пары оснований в пятом повторяющемся звене, которое включает последовательность CAT.

Заявитель таким образом исследовал причастность гена ТН к шизофрении путем поиска наличия изменений последовательности и длины в микросателлите HUMTHO1. Полученные результаты позволяют показать, что полный аллель является очень редким и присутствует только у больных шизофренией пациентов. Эти результаты были воспроизведены на группах пациентов различного этнического происхождения. Так, в случае группы французов из 239 субъектов, 94 из которых больны шизофренией, были определены 6 различных аллелей, обозначаемых как A, B, C, D, E_i и E_p. Эти различные аллели различаются между собой четырьмя парами оснований (одно полное звено), за исключением двух более длинных, которые отличаются одной парой оснований. Секвенирование этих различных аллелей позволяет показать, что повторяющееся звено микросателлита HUMTHO1, последовательность TCAT, полностью повторяется в аллелях A, B, C и D, которые содержат соответственно 6, 7, 8 и 9 повторяющихся звеньев. Взамен аллель E, который включает 10 повторяющихся звеньев, в большинстве случаев имеет одну и ту же делецию тимидина в пятом повторяющемся звене. Эта делеция приводит к неполному аллелю с последовательностью (TCAT)₄ (CAT) (TCAT)₅, обозначаемому как E_i (в смысле неполный). Аллель E_i представляет собой аллель, наиболее часто встречающийся у жителей Кавказа (ссылка 5). Напротив, полный аллель E с последовательностью (TCAT)₁₀ (обозначают как E_p) является очень редко встречающимся. Так, в случае совокупности испытываемой популяции больных шизофренией, только 5 пациентов имели полный аллель. Полученные результаты неожиданно показывают, что все субъекты, обладающие аллелем E_p, являются пациентами, больными шизофренией, тогда как этот аллель отсутствует у служащих в качестве контроля 145 здоровых людей (см. таблицу 1). Эти результаты демонстрируют в высшей степени значительную связь между наличием аллеля E_p и шизофренией. Кроме того, 5 пациентов с шизофренией, имеющих аллель E_p, представляют собой единичные случаи шизофрении, клиническим подтипом которых является параноидная шизофрения в одном случае, недифференцированная шизофрения в трех случаях и дезорганизованная шизофрения в одном случае.

Заявитель затем распространил это исследование на другую популяцию другого этнического происхождения. Так, исследование подобной связи было проведено на группе из 88

тунисцев. Полученные результаты показывают, что частота различных аллелей А-Е, встречающихся у испытуемой группы тунисцев, значительно отличается от таковой, наблюдаемой в случае группы французов (см. таблицу 1). Однако, только 4 индивидуума оказались носителями полного аллеля Ер, причем все являются больными шизофренией пациентами (1 параноидная шизофрения и 3 недифференцированные шизофрении), и формы в этом случае также являются спорадическими формами.

Эти результаты представляют собой первую демонстрацию связи между ТН и шизофренией. Они ясно показывают, что полный аллель Ер микросателлита HUMTHO1 с последовательностью (TCAT)₁₀ может быть в значительной степени ассоциирован с шизофренией и тем самым представляет собой генетический инструмент для обнаружения этого типа патологии.

Специфичность связи этого аллеля с шизофренией, кроме того, была подтверждена изучением на группе из 100 пациентов, пораженных спорадическим маниакально-депрессивным психозом. Наличие аллеля Ер не было обнаружено ни у одного из этих пациентов.

Выявление связи между этим аллелем и шизофренией открывает многочисленные возможности применения в области диагностики и терапии. Таким образом, настоящее изобретение теперь, во-первых, открывает возможность диагностики шизофрении путем биологического теста, а не только за счет клинических аргументов. Одним объектом настоящего изобретения более конкретно является метод диагностики шизофрении, заключающийся в определении наличия аллеля Ер микросателлита HUMTHO1 в гене ТН. Этот метод также применим для диагностики патологий спектра шизофрении, таких как особенно шизотипия, индивидуумы с шизоидной конституцией, и т.д. Таким образом изобретение позволяет совершенствовать диагностические критерии этих патологий, которые на сегодняшний день имеют только клиническую природу. Кроме того, изобретение позволяет также выявлять склонности к этому типу психического расстройства путем идентификации генетической уязвимости в группах пациентов, являющихся носителями этого аллеля Ер. С терапевтической точки зрения, изобретение позволяет предпочтительно назначать более соответствующие медикаментозные лечения в зависимости от типа шизофрении. Подтверждая гипотезу о причастности к способу синтеза катехоламинов, изобретение позволяет применять более направленную терапию. Кроме того, если функциональные вмешательства за счет наличия аллеля Ер окончательно не установлены, то следует заметить, что микросателлит HUMTHO1 локализован в первом интроне гена ТН, области, в которой показана альтернативная ассоциация, приводящая к 4 изоформам ТН (ссылка 8). Следовательно, возможно, что генетические изме-

нения в этой области влияют на регуляцию экспрессии гена ТН, и это связано с появлением шизофрении.

Согласно первому аспекту, изобретение, следовательно, относится к методу диагностики шизофрении, отличающемуся тем, что проводят определение *in vitro* на наличие аллеля Ер микросателлита HUMTHO1 в гене ТН. Выявление этого аллеля, последовательности (TCAT)₁₀, является характеристикой некоторых видов шизофрении. Отсутствие этого аллеля не исключает наличия шизофрении, причем этот аллель встречается примерно в 5% случаев. Способ изобретения также применим для генетической характеристики видов шизофрении и подтипа шизофрении. Как указано выше, аллель Ер по видимому присутствует только в случае спорадических шизофрений. Способ согласно изобретению также применим для выявления склонности к шизофрении.

Согласно способу изобретения, определение аллеля Ер можно осуществлять различными способами. Из используемых способов можно предпочтительно назвать секвенирование, разделение в геле или еще метод SSCP.

Что касается секвенирования, то может быть использован любой метод, известный специалисту. Особенно предпочтительно использовать автоматический секвенатор ДНК. Секвенирование предпочтительно осуществляют на двунитевых матрицах методом терминации цепей, используя флуоресцентные праймеры. Соответствующий этой цели набор представляет собой набор для секвенирования Taq Dye Primer Kit фирмы Applied Biosystem. (Applied Biosystem, Foster City CA). Секвенирование микросателлита HUMTHO1, или, более конкретно, выделенного фрагмента, несущего этот микросателлит, позволяет прямо распознать аллель, имеющийся у пациента, и таким образом выявить присутствие или отсутствие аллеля Ер в последовательности (TCAT)₁₀. Полученные путем секвенирования результаты представлены, например, на фиг. 2.

Предпочтительным способом выявления аллеля Ер является разделение в геле. Этот способ обладает тем преимуществом, что позволяет делать различие между различными аллелями в зависимости от их величины без необходимости секвенировать фрагменты ДНК. Этот способ основан на миграции, при условии денатурации, денатурированных фрагментов ДНК в акриламидном геле (предпочтительно 6%-ном). Появление полос может быть осуществлено любым известным специалисту способом, основывающимся, например, на применении маркированных праймеров (особенно в виде γ - ³²фосфора), на введении α -dCTP в испытуемые фрагменты, на применении альфа-нерадиоактивных зондов, на проявлении с помощью этидиумбромидом, или еще путем гибридизации (блоттинг) с меченым

радиоактивным изотопом зондом. Вышеуказанная методика разделения в геле в качестве иллюстрации представлена в примерах. Как показано на фиг. 3, этот способ позволяет быстро и без секвенирования делать различие между аллелем А, В, С, D, Еi и Еr микросателлита.

Что касается способа идентификации с помощью SSCP, то речь идет также о методе разделения в акриламидном геле, но в неденатурирующих условиях. Этот способ позволяет различать различные фрагменты в зависимости от их конформации (см. примеры).

Способ согласно изобретению осуществляют на образце ДНК пациента. Этот образец должен содержать, по крайней мере, один микросателлит HUMTHO1. Предпочтительно он содержит первый интрон гена ТН или часть этого интрона. Еще более предпочтительно он включает фрагмент гена ТН, содержащий микросателлит HUMTHO1 с фланкирующими последовательностями на концах. Испытуемый образец ДНК может быть получен из взятых у пациента клеток. Речь идет предпочтительно о клетках крови (например, мононуклеарные клетки), которые легко получают простым взятием крови для анализа. Могут быть использованы другие типы клеток, такие как, в частности, фибробласты, эпителиальные клетки, кератиноциты и т.д. Затем из клеток экстрагируют ДНК и используют для определения аллеля Еr. Для этого полученная геномная ДНК может быть расщеплена рестрикционными ферментами, клонирована в соответствующих векторах, выбрана, например, по ТН или путем гибридизации с соответствующим первому интрону ТН зондом, затем проанализирована, как описано выше. В особенности предпочтительно, выделенную ДНК предварительно подвергают одной или нескольким реакциям амплификации, чтобы получить значительное количество материала, соответствующего области, несущей микросателлит HUMTHO1. Амплификацию можно проводить любым известным специалисту способом, и в частности, по способу так называемой катализируемой полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Saiki R.K. и др., Science, 230, 1350-1354 (1985); Mullis K.B. и Falona F.A., Meth, Enzym., 155, 335-350 (1987)). С этой целью амплификацию можно осуществлять при использовании "ДНК-термального цикла" (Perkin Elmer Cetus) согласно рекомендациям изготовителя. Используемые для амплификации условия температуры и среды представляют собой обычные условия, такие как описанные, например, у Maniatis и др., 1989. Специфические условия также приводятся в примерах.

Для осуществления настоящего изобретения предпочтительно используют фрагмент ДНК, несущий микросателлит HUMTHO1 достаточно маленькой величины. Это позволяет предпочтительно проводить различие между аллелями без необходимости прибегать к секве-

нированию. Кроме того, если осуществляют контрольные эксперименты по секвенированию, то также предпочтительно секвенировать только фрагменты ограниченного размера. Предпочтительно, используемым фрагментом ДНК является амплифицированный фрагмент величиной менее 300 пар оснований. Этот фрагмент содержит микросателлит HUMTHO1 и фланкирующие последовательности гена ТН, такие как представлено на фиг. 1. Еще более предпочтительно, амплифицированный фрагмент включает менее 200 пар оснований. Особенно замечательных результатов достигают с амплифицированными фрагментами величиной менее 160 пар оснований и даже 100 пар оснований. С этой целью в настоящем изобретении также описываются специфические праймеры, позволяющие проводить амплификацию фрагментов ДНК небольшой величины, несущих микросателлит HUMTHO1. Так, в изобретении описываются, в частности, 3 пары праймеров, позволяющих проводить, соответственно, амплификацию фрагментов величиной 192 пары оснований, 156 пар оснований и 77 пар оснований. Последовательность этих праймеров представлена в примерах, также как последовательность и положение в гене ТН амплифицированного фрагмента. Любой другой праймер, позволяющий осуществлять амплификацию фрагмента величиной менее 300 пар оснований, несущего, по крайней мере, один микросателлит HUMTHO1 и включающего фланкирующую область, происходящую от представленной на фиг. 1 последовательности, также составляет часть настоящего изобретения. Предпочтительно, праймеры согласно изобретению имеют длину от десяти до сорока нуклеотидов и предпочтительно 15-30 нуклеотидов. Последовательность этих праймеров может быть определена из последовательности, представленной на фиг. 1, в зависимости от величины амплифицированного фрагмента, его локализации вокруг микросателлита и выбранной длины праймеров.

Используемые в рамках изобретения праймеры могут быть синтезированы любым известным специалисту способом и особенно при использовании химии фосфорамидитов, возможно защищенных в положении β цианоэтильной группой (Sinha и др., 1984; Giles, 1985), с помощью автоматического синтезатора ДНК, такого как синтезатор фирмы Applied Biosystem, модель 394 (Applied Biosystem, Foster City CA), согласно рекомендациям изготовителя. Праймеры также могут быть маркированы любым известным специалисту способом.

Испытуемым образцом ДНК может быть геномная ДНК, кДНК или также РНК. Более предпочтительно речь идет о продукте амплификации геномной ДНК, амплифицированной с помощью специфических праймеров, таких как описанные выше.

Другим объектом настоящего изобретения является набор для определения аллеля Ер, включающий комплект из двух праймеров, таких как указанные выше. Этот набор, предпочтительно представляет собой набор для диагностики шизофрении.

Как указано выше, настоящее изобретение, во-первых, относится к генетическому методу определения и генетической характеристики заболеваний спектра шизофрении. Кроме указанных применений для диагностики этот метод также открывает широкие терапевтические возможности, связанные особенно с наилучшей направленностью лечения в зависимости от соответствующего заболевания.

Настоящее изобретение описывается более подробно с помощью нижеследующих примеров, которые нужно рассматривать как иллюстративные, но не ограничивающие объемов, притязаний.

Перечень фигур

Фиг. 1 - последовательность части первого интрона гена ТН, включающая микросателлит HUMTHO1. Указано положение праймеров амплификации.

Фиг. 2 - выявление путем секвенирования аллеля Ер микросателлита HUMTHO1.

Фиг. 3 - выявление путем разделения в геле аллеля Ер микросателлита HUMTHO1.

Таблица 1 - распределение аллелей микросателлита HUMTHO1 у испытуемых людей, пораженных или не пораженных шизофренией.

Примеры

1. Получение ДНК.

Образцы крови помещают на гепарин и мононуклеарные клетки выделяют на градиенте Ficoll luraque (Pharmacia, Upsala, Швеция). ДНК затем экстрагируют стандартными способами. Для прямой экстракции ДНК используют следующую методику.

Собранную кровь выливают в пробирки емкостью 50 мл и добавляют лизирующий буфер для разрушения эритроцитов (лизирующий буфер: 40 мл ТРИС-НСI, 1н, рН = 7,5, +20 мл 0,5 м ЭДТУ + Н₂О до общего объема 2 л); конечный объем составляет 50 мл. Суспензию затем центрифугируют в течение 15 мин при температуре 4°C при скорости 2500 оборотов в минуту; супернатант отбрасывают, к осадку после центрифугирования снова добавляют 50 мл лизирующего буфера. Ту же самую операцию (центрифугирование, удаление супернатанта, обработка осадка после центрифугирования лизирующим буфером) повторяют два раза. По окончании этих трех центрифугирований осадок извлекают.

После этого добавляют: 5 мл лизирующего буфера (на 5 мл исходной крови);

125 мкл 20%-ного лаурилсаркозила;

50 мкл протеиназы К (20 нг/мл).

Полученный раствор перемешивают и выдерживают на водной бане в течение ночи при температуре 55°C и при перемешивании.

На следующее утро добавляют 2 объема 95%-ного этилового спирта (если объем = 5 мл, то конечный объем составляет 15 мл), затем раствор осаждают путем инверсии вплоть до образования хлопьев. Затем ДНК извлекают с помощью пипетки Р 1000 (со срезанным коническим концом) и помещают в пробирку емкостью 5 мл. После этого добавляют 80%-ный этиловый спирт и смесь помещают в холодильник. На следующее утро этиловый спирт заменяют, затем, вечером, спирт удаляют и хлопья оставляют высохнуть (пробирку помещают в перевернутом положении на бумажный носовой платок).

ДНК затем обрабатывают с помощью ТЕ IX, в зависимости от объема хлопьев количество ТЕ изменяется от 200 мкл до 1 мл. Выдерживают всю фракцию в течение ночи при температуре 37°C во вращающемся аппарате, затем концентрацию ДНК определяют путем спектрометрии.

2. Французы.

Исследуют 94 пациента различного происхождения, пораженных хронической шизофренией (62 мужчины и 32 женщины среднего возраста $42 \pm 12,3$), включая 21 семью.

Диагностику проводят, как описано в ссылке 9, используя данные из медицинских таблиц и прямых сведений (интервью) согласно французскому переводу "Таблицы аффективных расстройств и шизофренического беспокойства" (SADS - LA, ссылка 10). Каждому пациенту приписывают клинический подтип согласно описанной процедуре. Исследуют 145 здоровых людей, служащих в качестве контроля (84 мужчины и 61 женщина; средний возраст $48 \pm 8,3$), которые не страдают никаким психическим расстройством.

3. Тунисцы.

Исследуют 44 пациента различного происхождения, пораженных хронической шизофренией (33 мужчины и 11 женщин, средний возраст $37 \pm 8,2$), включая 13 случаев семей. Диагностику проводят согласно критерию DSM IIIР (ссылка 11), используя данные из медицинских таблиц. Этих пациентов сравнивают с 44 пациентами, служащими в качестве контроля, не связанных между собой (37 мужчин и 7 женщин; средний возраст $35 \pm 5,9$), не страдающих никаким психическим расстройством.

4. Праймеры, используемые для реакций амплификации.

Предназначенная для реакций амплификации матрица образована аллелем Ер микросателлита HUMTHO1, последовательность которого представляет собой (TCAT)₄(TCA)(TCAT)₅. Микросателлит локализован в положении 1070 последовательности гена ТН, такой как опубли-

кованная и доступная из банка генов (№ D00269).

Для амплификации с помощью ПЦР используют различные пары праймеров. Эти пары представлены ниже, также, как размер амплифицированного фрагмента. Положение этих праймеров в последовательности гена ТН представлено на фиг. 1 (см. также последовательность № 1).

Пара А:

1) 5' GGC AAA TAG GGG GCA AAA 3' (смысловая)(последовательность № 1) ; и

2) 5' TTA TCC AGC CTG GCC CAC 3' (антисмысловая)(последовательность № 2).

Предусматриваемая длина после амплификации составляет 192 пары оснований.

Пара В:

3) 5' GGC AAA TAG GGG GCA AAA 3' (смысловая) (последовательность № 3) и

4) 5' GGC TTC CGA GTG CAG GTC 3' (антисмысловая)(последовательность № 4).

Предусматриваемая длина после амплификации составляет 156 пар оснований.

Пара В:

5) 5' GTT CCT CCC TTA TTT CCC 3' (смысловая)(последовательность № 5) и

6) 5' AGG GAA CAC AGA CTC CAT 3' (антисмысловая) (последовательность № 6) .

Предусматриваемая длина после амплификации составляет 77 пар оснований.

5. Протокол реакций амплификации.

Используемая для реакции ПЦР смесь содержит: 40 нг геномной ДНК, полученной согласно примеру 1; по 200 ммолей каждого из следующих соединений: аденозин-5'-трифосфата, цитидин-5'-трифосфата, гуанозин-5'-трифосфата и тимидин-5'-трифосфата; 18 пмоль (100 нг) каждого из праймеров; 50 ммолей KCl; 10 ммолей ТРИС-HCl (рН = 8,5); 1,5 ммолей хлорида магния и 1,0 мКи (α - 32 P)цитидин-5'-трифосфата (Amersham, UK) в конечном объеме 15 мл.

После начальной денатурации в течение трех минут при температуре 96°C добавляют 0,75 единиц Taq-полимеразы к каждому образцу (ДНК + смесь) при температуре 92°C; за этой стадией следуют 30 циклов, включающих гиб-

ридизацию в течение 30 с при температуре 56°C, элонгацию в течение 30 с при температуре 72°C и денатурацию в течение 30 с при температуре 92°C.

6. Разделение на геле.

Три микролитра продукта, полученного в результате реакции ПЦР, смешанные с 3 микролитрами "терминирующего раствора" (0,025 бромфенолового синего и 0,025 ксилотрианола, 0,95 формамида деионизированного) вносят в денатулирующий гель (6%-ный, акриламид/бисакриламид в соотношении 19:1). После электрофоретической миграции (2500 В, 55 мА) гель вынимают из формы и высушивают. Его упаковывают в кассету (без экранирующего амплификатора) с помощью пленки ХОМАТ (Кодак) для ауторадиографии и экспонируют в течение ночи при комнатной температуре.

7. Протокол реакции ПЦР – SSCP.

Эту реакцию проводят в несколько стадий согласно следующему протоколу:

1. Амплификация путем ПЦР (полимеразная цепная реакция) целевой последовательности ДНК (150-200 пар оснований) с радиоактивной маркировкой двух нитей (использование α - 32 P-АТФ) или одной нити (использование одного из праймеров с γ - 32 P-АТФ).

Один миллилитр продукта ПЦР смешивают с 2,5 мл рабочего (загрузочного) буфера (80% деионизированного формамида, 50 ммолей тетрабромэтана, 1 ммолей этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТУ), 0,5% ксилотрианола, 0,5% бромфенолового синего).

2. Денатурация ДНК при 96°C в течение 3-5 мин.

3. Быстрое охлаждение образцов в таящем льду.

4. Быстрое внесение в неденатулирующий полиакриламидный гель (6%-ный) акриламид/бисакриламид в соотношении 37,5 : 1; 0,5X тетрабромэтана).

5. Электрофоретическая миграция при температуре 4°C и 50 Вт или при комнатной температуре и 10 Вт (с 10% глицерина в геле).

6. Ауторадиография высушенного геля.

Таблица 1

Алель	Франция		Тунис	
	Контроль ^a	Больные δ шизофренией	Контроль ^a	Больные шизофренией
A (TCAT) ₆	54 (18,6%)	40 (21,3%)	20 (22,7%)	18 (20,5%)
B (TCAT) ₇	54 (18,6%)	43 (22,9%)	20 (22,7%)	20 (22,7%)
C (TCAT) ₈	38 (13,1%)	18 (9,6%)	14 (15,9%)	8 (9,1%)
D (TCAT) ₉	52 (17,9%)	23 (12,2%)	21 (23,9%)	26 (29,5%)
E ₁ (TCAT) ₄ CAT(TCAT) ₅	92 (31,8%)	58 (30,8%)	13 (14,8%)	12 (13,6%)
Ep (TCAT) ₁₀	0 (0%)	6 (3,2%)	0 (0%)	4 (4,6%)

Список используемой литературы

1. Weber et al., Am. J. Hum. Genet. 44(1989)388.
2. Heame et al., Trends Genet. 8 (1992) 288.
3. Weber et al., Genomics 7 (1990) 524.
4. Edwards et al., Genomics 12 (1992) 241.
5. Puers et al., Am.J. Hum. Genet. 53 (1993) 953.
6. Craddock et al. Aim. of Medecine 25 (1993) 317.
7. Leboyer et al., Lancet 335 (1990) 1219.
8. Grima et al., Nature 326 (1987) 707.
9. American Psychiatric Association, Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders (3rd Edn) - Washington, DC = APA (1980).
10. Fyer et al., Anxiety Disorders clinic, New-York : New-York State Psychiatric Institute (1985).
11. American Psychiatric Association, Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders (3rd Edn revised) - Washington, DC = APA (1987).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ диагностики шизофрении, отличающийся тем, что определяют *in vitro* наличие аллеля Ер микросателлитной ДНК HUMTHO1 в гене тирозингидроксилазы.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что определение аллеля Ер осуществляют путем секвенирования ДНК, и/или путем разделения фрагментов ДНК в геле, и/или путем разделения фрагментов ДНК в геле в неденатурирующих условиях.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что аллель Ер определяют путем разделения фрагментов ДНК в геле.

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что используют ДНК, извлеченную из мононуклеарных клеток.

5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что ДНК перед определением аллеля Ер амплифицируют.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что амплифицируют ДНК, включающую первый интрон полной длины гена тирозингидроксилазы или часть указанного интрона.

7. Способ по п.6, отличающийся тем, что амплифицируют ДНК, представляющую собой фрагмент размером менее 300 пар оснований,

включающий микросателлит HUMTHO1 и фланкирующие последовательности.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что амплифицируют ДНК, представляющую собой фрагмент размером менее 200 пар оснований и, предпочтительно, менее 160 пар оснований.

9. Комплект из двух праймеров для осуществления способа по п.8, имеющих следующую структуру (пара А):

5' GGC AAA TAG GGG GCA AAA 3' (смысловая последовательность) и

5' TTA TCC AGC CTG GCC CAC 3' (анти-смысловая последовательность).

10. Комплект из двух праймеров для осуществления способа по п.8, имеющих следующую структуру (пара Б):

5' GGC AAA TAG GGG GCA AAA 3' (смысловая последовательность) и

5' GGC TTC CGA GTG CAG GTC 3' (анти-смысловая последовательность).

11. Комплект из двух праймеров для осуществления способа по п.8, имеющих следующую структуру (пара В):

5' GTT CCT CCC TTA TTT CCC 3' (смысловая последовательность)

5' AGG GAA CAC AGA CTC CAT 3' (анти-смысловая последовательность).

12. Набор для определения аллеля Ер микросателлитной ДНК HUMTHO1, включающий комплект праймеров по любому из пп. 9-11.

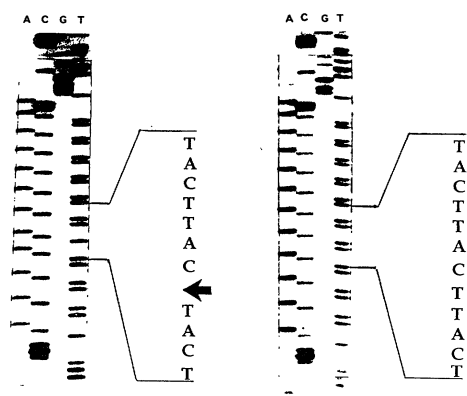
13. Набор по п.12 для диагностики шизофрении.

```

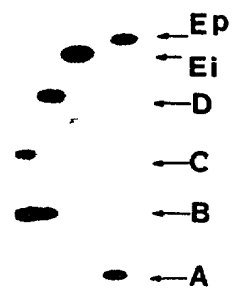
CTTGAATCTT AACGATCGGA ATGTGGAAC AAATCCTATCC AAAAAATCCA
AGATGGCCAG AGGTCCCGG CTGCTGCACC CAGCCCCAC CTAATCCCA
CCTGCCCTG CCTCCCTG CCCCAGCTGC CTAATCAGC ACCCAACCA
GCCTGCCTGC TTGGGGAGGC AGCCCCAAGG CCTTCCAG GCTTAGCAG
CAGCTCATGG TGGGGGCTCC TG1,3GGCAATA GGGGGCAAAA TTCAAAGGGT
ATCTGGGCTC TGGGGTGATT CCATTTGGCC T5GTTCCTCCC TTATTTCCCT
CATTCATTCA TTCAATTCATT CATTCATTCA TTCAATTCACC
ATGGAGTCTG TGTTCCTC6GT GACCTGCACT CGGAAGCC4CT
GTGTACAGGG GACTGTGTGG GCCAGGCTGG ATAA2TCGGGA GCTTTTCAGC
CCACAGGAGG GGTCTTCGGT GCCTCCTTGG GCACTCAGAA CCTTGGGCTC
CCTGGCACAT TTAATAATGGG TTTTATTTTA TGGACCTTGA TTGAAATGTG
GTGTGAGTTG TAGCAGTGTG ATTTCCAGGT ACCTTCTCAG GGACACAGGG
CGCCCTCCCC CGTCTCCCC CGCCCTCCCC TACCTCCCC CACCAGGCTC
CCCATC

```

Фиг. 1

E_T аллельE_r аллель

Фиг. 2



Фиг. 3



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, Москва, ГСП 103621, М. Черкасский пер., 2/6