ЛОКУС 9P21 И РЕВОЛЮЦИЯТА В ГЕНЕТИКАТА НА СЪРДЕЧНО-СЪДОВИТЕ ЗАБОЛЯВАНИЯ – РОЛЯ В СЪДОВАТА ПАТОЛОГИЯ И РИСКА ОТ РАЗВИТИЕ НА ИСХЕМИЧНА БОЛЕСТ НА СЪРЦЕТО

Р. Цвеова[1], Т. Янева[3], Г. Димитров[3], Д. Пендичева-Духленска[5], С. Вандева[4], Й. Матрозова[4], О. Белчева[1], Ат. Миткова[1], К. Найденов[2], С. Захариева[4], Р. Търновска-Кърдрева[3], Г. Начев[6], В. Митев[1] и Р. Кънева[1]

[1]Център по молекулна медицина, Катедра „Медицинска химия и биохимия", Медицински университет – София
[2]Катедра „Медицинска химия и биохимия", Медицински университет – София
[3]Клиника по кардиология, УМБАЛ „Александровска" – София
[4]Клиничен център по ендрокринология и геронтология, Медицински университет – София
[5]Катедра „Експериментална и клинична фармакология, дерматология и венерология", МУ – Плевен
[6]УСБАЛССЗ „Св. Екатерина" – София

LOCUS 9P21 AND THE REVOLUTION IN CARDIOVASCULAR GENETICS – CONTRIBUTION IN VASCULAR PATHOLOGY AND EVALUATION OF CORONARY ARTERY DISEASE RISK

R. Tzveova[1], T. Yaneva[3], G. Dimitrov[3], D. Pendicheva-duhlenska[5], S. Vandeva[4], Y. Matrozova[4], K. Naydenov[2], O. Beltcheva[1], AT. Mitkova[1], S. Zacharieva[4], R. Turnovska-Kadreva[3], G. Nachev[6], V. Mitev[1] and R. Kaneva[1]

[1]Molecular Medicine Center, Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Medical University – Sofia
[2]Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Medical University – Sofia
[3]Clinic of Cardiology, University Hospital "Aleksandrovska" – Sofia
[4]Clinical Center of Endocrinology and Gerontology, Medical University – Sofia
[5]Department of Experimental and Clinical Pharmacology, Dermatology and Venereology, Medical University – Pleven
[6]National University Specialized Hospital for Active Treatment "Sv. Ekaterina" – Sofia

Резюме. *Исхемичната болест на сърцето (ИБС) е многофакторно заболяване, възникващо в резултат на сложното взаимодействие на генетични и екологични рискови фактори. Към традиционните рискови фактори се отнасят тютюнопушенето, дислипидемията, артериалната хипертония (АХ), наднорменото тегло и диабетът. Резултатите от голям брой епидемиологични проучвания определят наследствеността като независим рисков фактор за развитие на заболяването. През 2007 г. три големи асоциативни изследвания на целия геном (GWASs), едновременно и независимо разкриват убедителни доказателства за връзката на полиморфни варианти в приблизително 100 kб регион на девета хромозома, локус 9p21 и риска от развитие на ИБС. Нещо повече, различни изследователски колективи показват връзката на вариациите в локус 9p21 с редица допълнителни характеристики на сърдечно-съдовите заболявания като формиране на плака в областта на сънната артерия, инсулт, аневризма, периферна артериална болест, сърдечна недостатъчност и сърдечно-съдова смъртност, което предполага една по-обща роля в съдовата патология. Понастоящем, асоциацията на този геномен участък с риска от развитие на ИБС е потвърдена при различни популационни групи. Той би могъл да се определи като „най-силния" генетичен маркер за болестта. Важно е да се отбележи, че локус 9p21 не показва асоциация с традиционните сърдечно-съдови рискови фактори, като нива на липиди и АХ, което показва, че генът(ите) и генетичните варианти в него оказват своя ефект чрез напълно нов механизъм.*

Ключови думи: *локус 9p21, исхемична болест на сърцето, рискови фактори*

Summary. *The coronary artery disease (CAD) is a multifactorial disorder which arises as a result of complex interaction of genetic and environmental risk factors. The traditional risk factors are smoking, dislipidemia, arterial hypertension (AH), obesity and diabetes. Furthermore, the results of a large number of epidemiological studies defined heredity as an independent risk factor for development of this disease.*

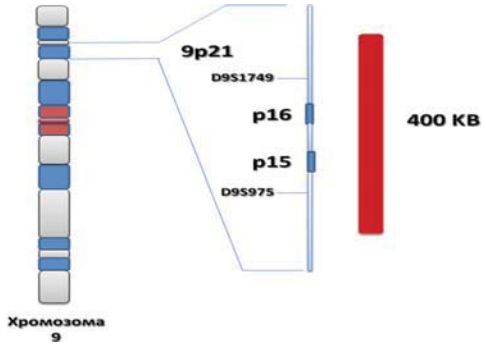
In 2007, three major studies demonstrated conclusive evidence of the association between common variations in approximately 100 kb region on 9p21 chromosome and CAD risk. Several studies have also demonstrated relationship of variations in the 9p21 locus with a number of additional features of cardiovascular diseases, such as formation of carotid artery plaques, ischemic stroke, aortic aneurysm, peripheral arterial disease, heart failure and cardiovascular death. All of this suggests a more general role of this locus in the vascular pathology. At present, the association between 9p21 polymorphisms and the risk of cardiovascular complications has been confirmed in different population groups and are considered the "strongest" genetic marker for coronary artery disease. Importantly, the locus 9p21 show no associations with traditional cardiovascular risk factors such as lipid levels and arterial hypertension, which demonstrates that this region exert its effect by completely novel mechanism

Key words: *locus 9p21, coronary artery disease, risk factors*

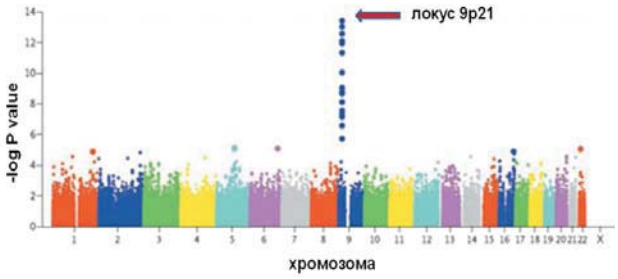
Исхемичната болест на сърцето (ИБС) се дължи на стеснение или запушване на една или повече коронарни артерии, в резултат на което достъпът на кислород към сърцето е прекъснат и настъпва миокардна исхемия. Това е многофакторно заболяване, чието проявление зависи от сложното взаимодействие на влиянието на средата и множество генетични компоненти. Основните рисковите фактори, оказващи съществено влияние за развитие на ИБС, са повишеното съдържание на холестерол в кръвта, артериалната хипертония (АХ), тютюнопушенето, наднорменото тегло, обездвижването, захарния диабет и др. Не на последно място важна роля имат и наследствените фактори.

Асоциативното проучване на целия геном е нов, съвременен подход за идентифициране на генетични локуси, свързани с предразположение към конкретно заболяване. Методът е изключително полезен при изучаване на генетичните основи на многофакторните заболявания, каквото е и ИБС. С негова помощ са идентифицирани голям брой локуси в различни части на човешкия геном, асоцииращи се с атеросклероза на коронарните артерии.

Първите резултати от GWASs относно ИБС и нейното най-често усложнение – миокарден инфаркт (МИ), са получени през 2007 г. Изследователите от два, консорциума Ottawa Heart Genomic Study и deCODE, едновременно и независимо идентифицират рисков генетичен вариант (rs1333049) за ИБС, разположен върху хромозома 9, локус 9p21 [1, 2] (фиг. 1-2). Интересното в случая е, че въпросният участък е лишен от белтък-кодиращи гени, въпреки че в съседство на него са разположени тумор-супресорните гени *CDKN2A и CDKN2B* [3]. По-късно откритите в този локус полиморфни варианти в близост до rs1333049 показват силна, статистически значима асоциация с ИБС при репликативни проучвания на групи болни и здрави контроли от различни популационни групи [4-8].



Фиг. 1. *Локализация на локус 9p21, асоциращ се с повишен риск от ИБС, върху късото рамо на деветата хромозома [9]*



Фиг. 2. *Сигнал за асоциация на локус 9p21 с повишен риск за развитие на ИБС, получен при геномно асоциативно изследване [10]*

Първоначалното откритие на 9p21 е направено в група сърдечноболни от европейски и азиатски произход. По-късно резултатите са потвърдени при репликативни асоциативни проучвания за различни групи етноси, като поляци [11], корейци [4], японци [12], китайци [5], италианци [13] и др.

В последващия 5-годишен период чрез GWASs са идентифицирани над 30 генетични варианта, определящи повишен риск от развитие на атеросклероза, от които само 6 са свързани с вече известни рискови фактори [14]. Към настоящия момент разполагаме с много малко функционална информация за тях, което се дължи на факта, че повечето са разположени в некодиращи участъци от генома. Предполага се, че полиморфните варианти в 9p21 са разположени в регулаторни участъци и оказват влияние върху експресията на белтък-кодиращи гени, намиращи се на относително голямо разстояние от тях. Определянето на механизмите, чрез които посочените полиморфни варианти упражняват влиянието си, допълнително се усложнява от наблюдението, че повечето от тях нямат модифициращ ефект върху други, вече известни рискови фактори за ИБС.

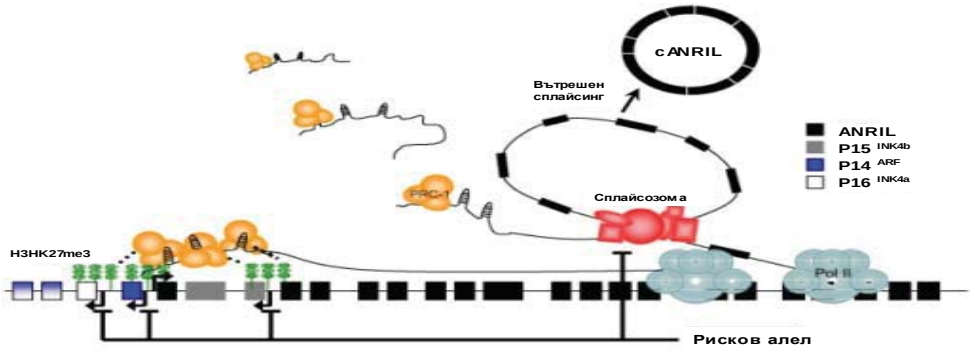
Локус 9p21 включва различни полиморфни варианти като rs1333049, rs10757274, rs10757278, rs2383206 и rs2383207, които се намират в неравновесна скаченост (фиг. 4). Първият полиморфизмът в региона, показал значителна асоциация с ИБС, е rs1333049. Метаанализ на около 40 000 болни с атеросклероза на коронарните съдове и съответстващите им брой здрави контроли показва, че около 25% от индивидите с европейски произход са носители на две копия на рисковия алел (хомозиготно състояние), което води до увеличаване на риска от ИБС до 1.6 пъти в сравнение с носителите на див тип алели. В допълнение, този вариант се асоциира с висок риск от формиране на коремна и вътречерепна аортна аневризма, артериална ригидност, тежка коронарна стеноза на кръвоносните съдове, както и коронарна артериална калцификация [14].

Установено е, че първоначално откритият полиморфен вариант в локус 9p21, асоцииран с ИБС, се среща приблизително при 75% от населението в световен мащаб. Изключение правят афроамериканците, при които въпросният вариант се среща с изключително ниска популационна честота. Вариантът представлява замяна на гуанин с цитозин в структурата на ДНК и се свързва с 25% повишен риск за развитие на ИБС при носителство на едно копие на полиморфния алел и 50% повишен риск при едновременното носителство на два рискови алела. Носителството на рисков алел при индивиди с ранно начало на ИБС се свързва с двукратно увеличение на риска от заболяването, като този риск е съизмерим с риска при пушачите и високите нива на холестерол в кръвта [14]. Вероятно най-забележителното откритие в случая е, че 9p21 е независим рисков фактор спрямо всички известни рискови фактори за атеросклероза на коронарните съдове, което показва, че съществуват фактори в патогенезата на заболяването, които са все още неизвестни или не добре изучени.

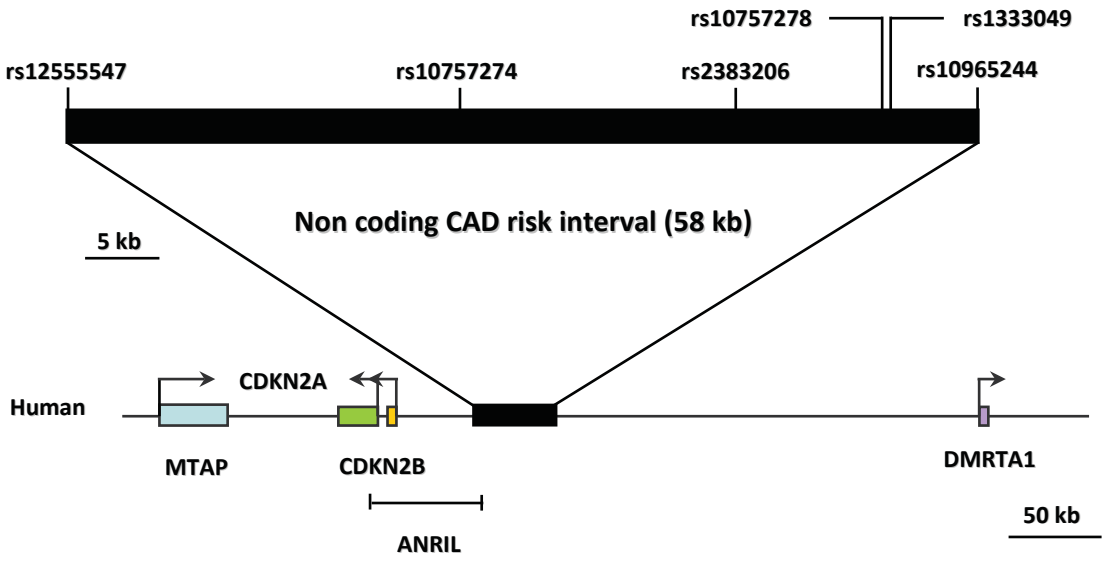
Рисковият за ИБС регион в късото рамо на девета хромозома обхваща над 126 000 б.дв и включва екзони 13-19 от CDKN2B некодираща РНК, известна като ANRIL – голяма некодираща РНК (фиг. 3) [3]. Генът *CDKN2B* се намира в непосредствена близост до *CDKN2A*, като и двата кодират циклин-зависими киназни инхибитори и са обект на изследване при редица ракови заболявания, поради ролята им за регулация на клетъчната пролиферация и диференциация [16].

Филогенетични изследвания показват, че CDKN2B-AS (ANRIL) е висококонсервативен при примати, но не присъства в ортоложните последователности от куче, мишка, плъх и опосум [18]. Регионът е сложен, с много повтарящи се последователности. Екзони 7 и 12 се състоят изцяло от Alu повтори; екзони 8 и 16 включват дълги, терминални повтори; екзон 14 съдържа дълги, разпръснати елементи (LINEs) от семейство LINE2; екзони 4, 17, и 20 съдържа множество MIR (mammalian – wide interspersed repeat). CDKN2B-AS обхваща участък с дължина 58 000 б.д., в който се съдържат множество еднонуклеотидни полиморфни варианти (SNPs), асоциирани с повишен риск от ИБС. Полиморфизмите извън този регион, дори и тези в гените *CDKN2A* или *CDKN2B*, показват само слаба връзка с исхемичната болест. Прави впечатление обаче, че експресията на два съседни гени, *CDKN2A* и *CDKN2B*, инхибира пролиферацията на клетките в съдовия ендотел, по-специално тази в гладката мускулатура [18].

Идентифицирането на хромозомен локус 9p21 като генетичен маркер за ИБС е откритие с изключителна важност за разви-



Фиг 3. *Генетичните варианти, свързани с повишен риск от сърдечно-съдови заболявания като ИБС и ИМ, са локализирани в последователност от генома, която произвежда дълга, некодираща РНК, наречена ANRIL. При хората с понижен риск от сърдечно-съдово увреждане вероятно се извършва снаждане на дългата РНК в два по-малки фрагмента: къса, линейна РНК и кръгова РНК (cANRIL). За разлика от тях, при хората с повишен риск от заболяване е установена по-дълга ANRIL РНК, която по-ефективно потиска генната експресия на INK4/ARF локуса. Експресията на свързаните с INK4/ARF гени предпазва от образуване на атеросклеротични плаки и следователно хора, при които този локус е потиснат, са по-предразположени към сърдечно-съдови заболявания [17]*



Фиг. 4*. Единични нуклеотидни полиморфизми в локус 9p21 [15]*

тието на генетиката на сърдечно-съдовите заболявания. Към настоящия момент, няма друг участък от генома, за който да е установена толкова силна връзка с риска от ИБС сама по себе си или с голям брой допълнителни характеристики на сърдечно-съдовите заболявания, каквито са формиране на атеросклеротични плаки в сънната артерия, мозъчен инсулт, аневризма, периферна артериална болест, сърдечна недостатъчност и сърдечно-съдовата смъртност [19-24]. Всичко това предполага една по-генерална роля на този геномен участък за съдовата патология. Локусът 9p21 се явява рисков фактор за всички етнически групи, с изключение на афроамериканци [14].

Изследвания на Decode и съав., базирани на GWAS, определят локус 9p21 като рисков за коремна аортна аневризма, интракраниални аневризми и инсулт [20]. Рискът за хетерозиготни и хомозиготни носители на рисков алел, е оценен съответно

на 1.36 и 1.74 за корема аортна аневризма и на 1.38 и 1.72 за интракраниални аневризми. Последващо изследване от Bilguvar и съавт., което включва 21 000 случая на инсулт, причинени от интракраниални аневризми, и 8000 контроли, показва повишен риск от 24% до 36% за инсулт в при пациенти с 9p21 рисков алел [19].

Цялосно геномно проучване, проведено от Wahlstrand и съавт. в Швеция, показва, че локус 9p21 е свързан с повишен риск от инсулт, независимо от наличието на артериална хипертония [22]. Последващи изследвания потвърждават асоциацията на 9p21 алел с развитието на интракраниални аневризми. Yasuno и съавт. използват масиви от 832 000 SNPs за провеждането на GWAS при 5891 случаи на интракраниални аневризми и 14 181 контроли и определят носителството на 9p21 рисков алел за главен рисков фактор за инсулт и вътречерепни аневризми [23]. Matarin и съавт. също определят локус 9p21 като рисков фактор за инсулт, което е в съответствие с резултатите от предишни GWASs изследвания [21].

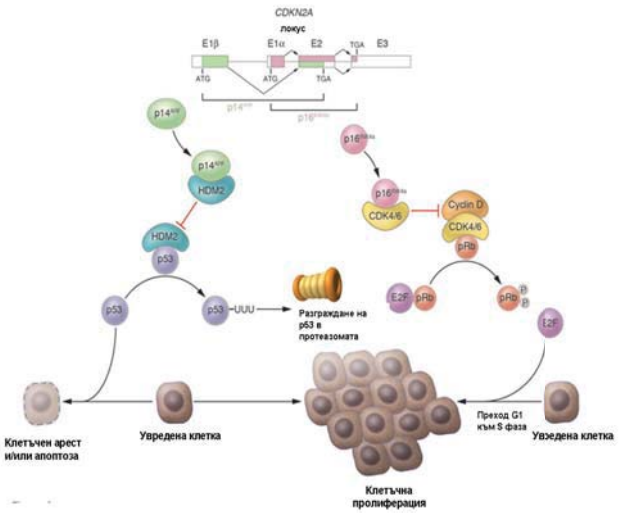
Освен това, генетичните варианти в локус 9p21 са важни предиктори за тежестта на коронарното заболяване и за броя на засегнатите коронарни съдове [25]. Тази роля е оценена при пациенти с ранно начало на ИБС и е потвърдена в независима извадка от лица с късно начало на заболяването. Полиморфни варианти в локус 9p21 при индивиди с ранно начало на атеросклероза определят 50% повишен риск за хетерозиготните носители на рисков алел и двукратно повишен риск за хомозиготните носители, сравними с двукратно повишения риск при пушачите [26], 40% по-високия риск от 10 mm повишаване на кръвното налягане [27] и 30% увеличения риск, свързан със стандартно отклонение в посока на увеличение на нивата на LDL холестерол или стандартно отклонение в посока на понижаване на HDL холестерол [28].

Важно е да се отбележи, че липсват асоциации на 9p21 с някои общи рискови фактори, като например нива на липиди и стойности на артериалното налягане, което показва, че този генетичен маркер упражнява ефекта си чрез напълно нов механизъм [1, 2, 10, 14, 29]. Едно от предположенията в тази насока е, че основният хаплотипен блок във въпросния участък на генома е локализиран в район, лишен от протеин-кодиращи гени. Ядрото на хромозома 9 локус p21 е разположено в близост до т.нар. INK4/ARF локус. Загубата на този локус води до промяна в контрола на клетъчния цикъл и е едно от най-честите събития при развитието на тумори. Въпросният участък включва протеин-кодиращи гени, намиращи се на растояние от няколко килобази, проксимално на 9p21 региона. Тези гени кодират циклин-зависими, киназни инхибитори. *CDKN2B* кодира p15INK4b, *CDKN2A* кодира p16INK4a и p14ARF и *MTAP* кодира метиллиоаденозин фосфорилаза. *CDKN2A* и *CDKN2B* участват в контрола на клетъчния цикъл, докато *MTAP* играе съществена роля в репарацията на аденин и метионин, което е важно за пролиферацията на гладкомускулните клетки [3, 24].

Генът *CDKN2A* е картиран в локус 9p21 (т.нар. INK4A локус) в човешкия геном и играе ключова роля в регулацията на клетъчния цикъл, като кодира циклин-зависим киназен инхибитор. Това определя функцията му на тумор-супресорен ген. Този ген произвежда няколко транскрипционни продукта, различаващи се по първите си екзони. Докладвани са най-малко три такива продукта, два от които кодират структурно свързани изоформи, които е известно, че действат като инхибитори на CDK4/6 киназата. Това се постига чрез избирателното използване на алтернативен първи екзон (екзон E1α в $p16^{INK4A}$ и екзон E1β в $p14^{ARF}$) (фиг. 5) [30]. $P16^{INK4}$ и 14^{ARF} притежават идентичен втори и трети екзон, а се различават по своя първи екзон, в резултат на което представляват два различни в структурно и функционално отношение протеина. Първият екзон на гена има две алтернативни рамки на четене – α и β, $p16^{INK4}$ и $p14^{ARF}$ се експресират едновременно [31].

P16 (циклин-зависима киназа инхибитор 2A) е член от семейството на INK4 киназните инхибитори. P16 играе важна роля в регулирането на клетъчния цикъл и мутациите в гена, кодиращ този белтък, повишават риска от развитие на различни видове рак – особено меланома. Вторият транскрипт на гена включва алтернативен първи екзон, нами-

ращ се на 20 Kb пред самия ген. Този транскрипт съдържа отворена рамка четене (ARF), която кодира протеин, структурно свързан с продуктите на другия транскрипционен вариант. Този продукт е p14^{ARF} и функционира като тумор-супресор [33].



Фиг. 5. *CDKN2A локус и контрол на клетъчния жизнен цикъл [32]*

Доказано е, че p16 взаимодейства с различни белтъци: SERTAD1 [34] [35], CCNG1 [36], DAP – киназа 6 [37], P53 [38-40], E4F1 [39], циклин-зависима киназа 4 [34, 35, 41-44], циклин-зависима киназа 6 [42], Mdm2 [45, 46] и RPL11 [38]. Белтъкът p16^{INK4A} инхибира активирането на CDK4 и CDK6 от циклин D1 (CCND1), като по този начин предотвратява последващо фосфорилиране на Rb1. Нефосфорилираните Rb1 единици се свързват към транскрипционен фактор E2F и не позволяват клетката да премине от G1- към S-фазата на клетъчния цикъл. Липсата на функционален p16^{INK4A} продукт, следователно води до хиперфосфорилирането на Rb1, в резултат на което се стига до освобождаване на E2F и прогресия на клетъчния цикъл [43].

За разлика от p16^{INK4A} p14^{ARF} регулира дейността на тумор-супресорния протеин p53 чрез инхибиране на MDM2 (убиквитиниращ ензим), който в противен случай насочва целият p53 за разграждане в протеазомата. Високите нива на p14^{ARF} стабилизират p53, което му позволява да активира p21WAF1/CIP1 комплекс, инхибитор на клетъчния цикъл, който блокира CDK2/cyclin E (CCNE1) медиираното фосфорилиране на Rb1. При липса на функционален p14^{ARF} протеин, настъпва неконтролирано убиквитиниране и деградацията на p53. По този начин се отстранява тази важна спирачка на клетъчния цикъл, което в крайна сметка води до хиперфосфорилиране на Rb1 и прогресия на клетъчния цикъл [43].

Концентрациите на p16 се увеличат драматично в по-възрастни тъкани. Затова концентрационните нива на p16 потенциално биха могли да бъдат използвани като кръвен тест, като мярка за определяне скоростта на застаряване на клетките на молекулярно ниво [47]. CDKN2A може да бъде инактивиран чрез различни механизми, например мутации или хомозиготни делеции в самия ген [48]. Друг механизъм за инактивация на гена е чрез промоторно хиперметилиране, водещо до потискане на експресията на гена [49].

Потенциалната връзка между 9p21 и атеросклероза би могло да се свърже с антипролиферативното действие на циклин-зависимите киназни инхибитори, за които е известно, че са потиснати при индивиди с 9p21 рисков алел [14]. Тъй като клетъчната пролиферация и апоптоза са с важна роля в атерогенезата, то е очевидно, че гените в INK4/ARF може да представляват кандидати за атеросклероза [14]. Проучванията на Folkersen и съавт. показват повишена експресия на *CDKN2A*, *CDKN2B* и *MTAP* в нормални и атеросклерозирали коронарни артерии [50]. Въпреки това, експресионните нива на тези гени в проводящата тъкан не са показали ясна асоциация с генотипа на локус 9p21, което говори срещу ролята на променената експреся на тези гени в проводящата тъкан при определяне на предразположеността към атеросклероза. Редица други проучвания изследват връзката между експресята на *CDKN2A, CDKN2B* и *MTAP* в периферни кръвни клетки, но по-голямата част от получените резултати са негативни.

Съвсем наскоро бяха проведени функционални изследвания, фокусирани върху диференцираната експресия на антисенс некодиращите РНКи на INK4 (ANRIL), които се транскрибират от локус 9p21, както и от съседните белтък-кодиращи гени INK4/

ARF. Зараждащата се идея предполага, че ANRIL може да е регулатор на епигенетична модификация и по този начин да модулира сърдечно-съдовия риск [51, 52].

Генетичните варианти могат да повлияят фенотипа чрез промяна или на характера на генния продукт (неговото качество) или на неговата експресията (количество). Повечето от рисковите варианти в 9p21 са разположени в некодиращи региони, далеч от белтък-кодиращи гени. Това показва, че ефектът им вероятно се дължи на влиянието им върху генната експресия на един или повече гени, разположени на по-голямо разстояние в генома.

Няколко проучвания разкриват, че локус 9p21 взема участие във формирането на атеросклеротичната плака и еветуално в прогресията на атеросклерозата, без обаче да оказва ефект върху руптурата на плаката или механизмите на тромбозата – основните събития, водещи до инфаркт на миокарда [7, 8, 11, 12, 13]. Независими експериментални изследвания показват, че вариации в локус 9p21 са рисков фактор не само за коронарно заболяване, но и за коремни аортни аневризми и интракраниални аневризми [19, 20, 21, 22, 23]. Към настоящият момент тези фенотипни ефекти са без обяснение, тъй като нито коремните аневризми, нито интракраниалните са свързани с патогенезата на атеросклерозата като цяло. В основата на етиологията на аневризмите стои изтъняване и загуба на тъкан от стената на кръвоносния съд, което води до неговото разкъсване.

Някои проучвания предполагат, че локус 9p21 участва при иницииране на процеса на атеросклероза, а не е свързан с неговото развитието или тежестта на заболяването [53], докато други са на противоположното мнение [54, 55]. Всички проучвания обаче показват, че полиморфни варианти в 9p21 определят по-висок риск за развитие на ИБС или МИ в по-млада възраст (преди 55 години при мъжете и преди 60 – при жените) [53].

Друго възможно обяснение на връзката между изследвания локус 9p21 с повишения риск от атеросклероза е наличието на множество енхансери в регион CDKN2B-AS, отговорни за повишената експресия на гени, индуциращи клетъчната пролиферация. В своето изследване Harismendy и съавт. идентифицират 33 на брой енхансера в рамките на въпросната секвенция [56].

Исхемичната болест се характеризира с добро познаване на етиологията и епидемиологията, но познанията относно влиянието на генетичните фактори върху развитието на заболяването остава доста неясно. Съществуват сериозни затруднения при обединяване на негенетичните и генетичните фактори при определянето на риска от развитие на това често срещано усложнение. Въпреки продължаващите проучвания в тази насока, е необходимо време и още много задълбочени изследвания преди генетична информация да придобие значима стойност за подобряване на оценката на риска при индивиди с ИБС.

Генетичните проучвания са интересен подход, който може да подпомогне по-доброто разбиране на етиопатогенезата на сърдечно-съдовите заболявания и евентуално да позволи по-добра идентификация на високорисковите индивиди. Данните, публикувани до момента, обаче не подкрепят въвеждането в клиничната практика на рутинни изследвания за гореописаните генетични маркери при всички болни с ИБС или МИ. При специфични групи пациенти, например млади болни, при които липсват конвенционалните рискови фактори за този тип заболявания, генетичните фактори най-вероятно имат значително по-голямо влияние върху сърдечно-съдовия риск.

Библиография

1. Helgadottir, A. et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. – Science, **316**, 2007, № 5830, 1491-1493.
2. McPherson, R. et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. – Science, **316**, 2007, № 5830, 1488-1491.
3. Pasmant, E. et al. Characterization of a germ-line deletion, including the entire INK4/ARF locus, in a melanoma-neural system tumor family: identification of ANRIL, an antisense noncoding RNA whose expression coclusters with ARF. – Cancer research., **67**, 2007, № 8, 3963-3969.
4. Shen, G. Q. et al. Four SNPs on chromosome 9p21 in a South Korean population implicate a genetic locus that confers high cross-race risk for development of coronary artery disease. – Arterioscl. Thromb. Vascular. Biology, **28**, 2008, № 2, 360-365.
5. Ding, H. et al. 9p21 is a shared susceptibility locus strongly for coronary artery disease and weakly for ischemic stroke

in Chinese Han population. – Circ. Cardiovasc. Genet., **2**, 2009, № 4, 338-346.
6. Hiura, Y. et al. Validation of the association of genetic variants on chromosome 9p21 and 1q41 with myocardial infarction in a Japanese population. – Circ. J., **72**, 2008, № 8, 1213-1217.
7. Assimes, T. L. et al. Susceptibility locus for clinical and subclinical coronary artery disease at chromosome 9p21 in the multi-ethnic ADVANCE study. – Hum. Mol. Genet., **17**, 2008, № 15, 2320-2328.
8. Saleheen, D. et al. Association of the 9p21.3 locus with risk of first-ever myocardial infarction in Pakistanis: case-control study in South Asia and updated meta-analysis of Europeans. – Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, **30**, 2010, № 7, 1467-1473.
9. http://www.kreatech.com. [cited; Available from:
10. Samani, N. J. et al. Genomewide association analysis of coronary artery disease. – N. Eng. J. Med., **357**, 2007, № 5, 443-453.
11. Niemiec, P. et al. The rs10757278 polymorphism of the 9p21.3 locus is associated with premature coronary artery disease in Polish patients. – Genetic Testing and Molecular Biomarkers, **16**, № 9, 1080-1085.
12. Hinohara, K. et al. Replication of the association between a chromosome 9p21 polymorphism and coronary artery disease in Japanese and Korean populations. – J. Human Genetics, **53**, 2008, № 4, 357-359.
13. Shen, G. Q. et al. Association between four SNPs on chromosome 9p21 and myocardial infarction is replicated in an Italian population. – J. Human Genetics, **53**, 2008, № 2, 144-150.
14. Roberts, R. et A. F. Stewart. 9p21 and the genetic revolution for coronary artery disease. – Clin. Chemistry, **58**, 2012, № 1, 104-112.
15. Ogawa, N. et al. Genome-wide association study of coronary artery disease. – Int. J. Hypertension, 2010, 2010, 790539.
16. Ivanchuk, S. M. et al. The INK4A/ARF locus: role in cell cycle control and apoptosis and implications for glioma growth. – J. Neuro-Oncology, **51**, 2001, № 3, 219-229.
17. Burd, C. E. et al. Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA correlates with atherosclerosis risk. – PLoS genetics, **6**, 2010, № 12, e1001233.
18. Jarinova, O. et al. Functional analysis of the chromosome 9p21.3 coronary artery disease risk locus. – Arterioscl., Thromb., Vascular. Biology, **29**, 2009, № 10, 1671-1677.
19. Bilguvar, K. et al. Susceptibility loci for intracranial aneurysm in European and Japanese populations. – Nat. Genet., **40**, 2008, № 12, 1472-1477.
20. Helgadottir, A. et al. The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. – Nat. Genet., **40**, 2008, № 2, 217-224.
21. Matarin, M. et al. Whole genome analyses suggest ischemic stroke and heart disease share an association with polymorphisms on chromosome 9p21. – Stroke J. cerebral. circulation, **39**, 2008, № 5, 1586-1589.
22. Wahlstrand, B. et al. The myocardial infarction associated CDKN2A/CDKN2B locus on chromosome 9p21 is associated with stroke independently of coronary events in patients with hypertension. – J. Hypertens, **27**, 2009, № 4, 769-773.
23. Yasuno, K. et al. Genome-wide association study of intracranial aneurysm identifies three new risk loci. – Nature Genetics, **42**, 2010, № 5, 420-425.
24. Holdt, L. M. et D. Teupser. Recent studies of the human chromosome 9p21 locus, which is associated with atherosclerosis in human populations. – Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, **32**, 2012, № 2, 196-206.
25. Dandona, S. et al. Gene dosage of the common variant 9p21 predicts severity of coronary artery disease. – J. Am. Coll. Cardiol., **56**, 2010, № 6, 479-486.
26. Schaefer, E. J. et al. Lipoprotein(a) levels and risk of coronary heart disease in men. Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial. – JAMA, **271**, 1994, № 13, 999-1003.
27. Sesso, H. D. et al. Systolic and diastolic blood pressure, pulse pressure, and mean arterial pressure as predictors of cardiovascular disease risk in men. – Hypertension, **36**, 2000, 801-807.
28. Di Angelantonio, E. et al. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. – JAMA, **302**, 2009, № 18, 1993-2000.
29. Consortium WTCC. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. – Nature, **447**, 2007, 661- 678.
30. Kamijo, T. et al. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. – Cell, **91**, 1997, № 5, 649-659.
31. Jares, P. et al. Disregulation of p16MTS1/CDK4I protein and mRNA expression is associated with gene alterations in squamous-cell carcinoma of the larynx. – Int. J. Cancer, **81**, 1999, № 5, 705-711.
32. Chudnovsky, Y., P. A. Khavari et A. E. Adams. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. – J. Clinical Investigation, **115**, 2005, № 4, 813-824.
33. Stone, S. et al. Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. – Cancer Res., **55**, 1995, № 14, 2988-2994.
34. Li, J. et al. The nuclear protein p34SEI-1 regulates the kinase activity of cyclin-dependent kinase 4 in a concentration-dependent manner. – Biochemistry, **43**, 2004, № 14, 4394-4399.
35. Sugimoto, M. et al. Regulation of CDK4 activity by a novel CDK4-binding protein, p34(SEI-1). – Genes & Development, **13**, 1999, № 22, 3027-3033.
36. Zhao, L. et al. Cyclin G1 has growth inhibitory activity linked to the ARF-Mdm2-p53 and pRb tumor suppressor pathways. – Mol. Cancer Res., **1**, 2003, № 3, 195-206.
37. Ivanchuk, S. M., S. Mondal et J. T. Rutka. p14ARF interacts with DAXX: effects on HDM2 and p53. – Cell Cycle, **7**, 2008, № 12, 1836-1850.
38. Zhang, Y. et al. Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway. – Mol. Cell. Biol., **23**, 2003, № 23, 8902-8912.
39. Rizos, H. et al. Association of p14ARF with the p120E4F transcriptional repressor enhances cell cycle inhibition. – J. Biol. Chem., **278**, 2003, № 7, 4981-4989.
40. Zhang, Y., Y. Xiong et W. G. Yarbrough. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. – Cell., **92**, 1998, № 6, 725-734.
41. Ewing, R. M. et al. Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. – Mol. Syst. Biol., 2007, № 3, 89.
42. Fahraeus, R. et al. Inhibition of pRb phosphorylation and cell-cycle progression by a 20-residue peptide derived from p16CDKN2/INK4A. – Curr. Biol., **6**, 1996, № 1, 84-91.
43. Serrano, M., G. J. Hannon et D. Beach. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. – Nature, **366**, 1993, № 6456, 704-707.

44. Coleman, K. G. et al. Identification of CDK4 sequences involved in cyclin D1 and p16 binding. – J. Biolog. Chem., **272**, 1997, № 30, 18869-18874.
45. Clark, P. A., S. Llanos et G. Peters. Multiple interacting domains contribute to p14ARF mediated inhibition of MDM2. – Oncogene, **21**, 2002, № 29, 4498-4507.
46. Pomerantz, J. et al. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2‘s inhibition of p53. – Cell., **92**, 1998, № 6, 713-723.
47. Liu, Y. et al. Expression of p16(INK4a) in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging. – Aging. Cell., **8**, 2009, № 4, 439-448.
48. Kamb, A. et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. – Science, **264**, 1994, № 5157, 436-440.
49. Merlo, A. et al. 5‘ CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. – Nature medicine, **1**, 1995, № 7, 686-692.
50. Folkersen, L. et al. Relationship between CAD risk genotype in the chromosome 9p21 locus and gene expression. Identification of eight new ANRIL splice variants. – PloS one, **4**, 2009, № 11, e7677.
51. Holdt, L. M. et D. Teupser. Recent studies of the human chromosome 9p21 locus, which is associated with atherosclerosis in human populations. – Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol., **32**, № 2, 196-206.
52. Yap, K. L. et al. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. – Molecular cell., **38**, 2010, № 5, 662-674.
53. Chen, Z. et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of early-onset coronary artery disease. – Mol. Biol. Rep., **36**, 2009, № 5, 889-893.
54. Patel, R. S. et al. The chromosome 9p21 risk locus is associated with angiographic severity and progression of coronary artery disease. – Eur. Heart J., **31**, № 24, 3017-3023.
55. Ardissino, D. et al. Influence of 9p21.3 genetic variants on clinical and angiographic outcomes in early-onset myocardial infarction. – J. Am. Coll. Cardiol., **58**, № 4, 426-434.
56. Harismendy, O. et al. 9p21 DNA variants associated with coronary artery disease impair interferon-gamma signalling response. – Nature, **470**, 7333, 264-268.

Адрес за кореспонденция

Д-р Р. Цвеова
Център по молекулярна медицина
Катедра "Медицинска химия и биохимия
Медицински университет
ул. "Св. Г. Софийски" № 1
1431 София

Adress for correspondance:
R. Tsveova, MD
Centrer of Molecular Medicine
Department of Medical Chemistry and Biochemistry
Medical University
1, Sv. G. Sofiyski, St.
1431 Sofia