ივ. ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფოუნივერსიტეტი

სადოქტორო პროგრამა „ბიოლოგია“

გენეტიკა

დოქტორანტის სემინარი 2

ნეიროდეგენერაციის გენეტიკური მექანიზმები

გენომური არასტაბილურობის შესწავლა ნერვულ უჯრედებშიტელეანგიექტაზიის დროს (ლუი-ბარის სინდრომი)

მიქაია ნანო

სამეცნიერო ხელმძღვანელები:

პროფესორი თეიმურაზ ლეჟავა,

ასოც. პროფესორი თინათინ ჯოხაძე

თბილისი 2018

შესავალი

ატაქსია ტელეანგიექტაზია ანუ ლუი-ბარის სინდრომი ადრეული ასაკის მძიმე, ნეიროდეგენერაციული, მულტიფაქტორული დაავადებაა. პათოლოგიური ცვლილებების საფუძველს ლუი-ბარის სინდრომის დროს წარმოადგენს გენეტიკური დარღვევები. იგი დამემკვიდრების აუტოსომურ რეცესიული ტიპით ხასიათდება. რეცესიულ გენს დაავადებული იღებს ორივე მშობლისგან. გენეტიკური საფუძელი დაკავშირებულია ATM გენის მუტაციასთან და გენომის არასტაბილურობასთან. ასევე განპირობებულია დნმ-ის რეპარაციული ფუნქციის დარღვევით. ამ დროს განსაკუთრებით ზიანდება იმუნური სისტემის უჯრედები. დამახასიათებელია T-უჯრედული იმუნიტეტის ნაკლებობა სისხლში, რის საფუძველზეც ვითარდება სხვადასხვა ინფექციური დაავადებები, მათ შორის რესპირატორული ინფექციები. ასევე იმუნოგლობულინების დეფიციტი (განსაკუთრებით IgA და IgE, იშვიათად IgG). ის გამოწვეულია ნათხემის და მისი კავშირების ან პროპრიოცეპტული სენსორული გზების პათოლოგიებით.

უჯრედის დაზიანების ამოცნობისა და რეპარირების ფუნქციის დათრგუნვა იშვათი, გენეტიკური არასტაბილურობის სინდრომის მქონე პაციენტებში იწვევს სიმსივნის განვითარების რისკის გაზრდას. ლუი-ბარის სინდრომის მქონე პაციენტებშიც მაღალია სხვადასხვა ტიპის სიმსივნეების განვითარების რისკი.

გენომის არასტაბილურობა დაკავშირებულია მე-14 ქრომოსომაში გრძელი მხრის ტრანსლოკაციებთან და გეპების არსებობასთან. გენომის არასტაბილურობა წარმოადგენს სწორედ იმის საფუძველს, რომ სიმსივნური დაავადებები ლუი-ბარის სინდრომით დაავადებულებში 1000-ჯერ უფრო ხშირად გვხვდება. ყველაზე გავრცელებული მათ შორის არის ლეიკემია და ლიმფომა. ლუი-ბარის სინდრომის შემთხვევაში ონკოპათოლოგიის ძირითადი მიზეზი არის პაციენტების გაზრდილი მგრძნობელობა მაიონებელი გამოსხივებისადმი, რომელიც მთლიანად გამორიცხავს რადიაციული თერაპიის გამოყენებას მათ მკურნალობაში.

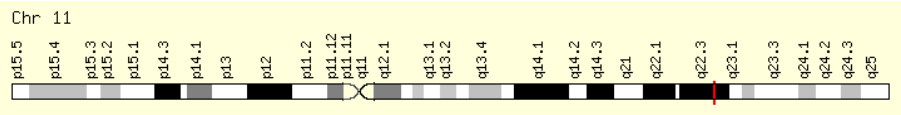
გენეტიკური ატაქსიის კლასიფიკაცია შეიძლება მოხდეს მემკვიდრეობის ტიპის მიხედვით, მაგალითად, აუტომურ-დომინანტური, აუტოსომურ-რეცესიული და X-შეჭიდული. ხშირად გამოვლენილ გენეტიკური ატაქსიის კლინიკურ სურათში წამყვანია ნათხემისეული სიმპტომები. თუმცა ბევრი მემკვიდრული მეტაბოლური დარღვევა, განსაკუთრებით, ბავშვებში ვლინდება ატაქსიის მკვეთრად ან მცირედ გამოხატული ვარიანტით. ზოგადად, ატაქსიის გენეტიკური ფორმები ნათხემის და მიმდებარე სტრუქტურების ატროფიის შედეგად ვითარდება და შეიძლება გამოვლინდეს ვიზუალიზაციის მეთოდებით.

ბოლო პერიოდში ყურადღება გამახვილდა მემკვიდრული ატაქსიების მოლეკულურ მექანიზმებზე. აღმოჩენილია 40-ზე მეტი დეფექტური გენი, რომლებიც

იწვევენ რეცესიულ, დომინანტურ, X-შეჭიდულ და მიტოქონდრიული მუტაციით გამოწვეულ ატაქსიებს. მოწოდებული იყო ბევრი პათოგენეზური ვარიანტი, მათ შორის ოქსიდაციური სტრესი, სუნთქვის ჯაჭვის მოშლა, ციტოსკელეტური ანომალიები, დნმ-ის რეპარაციის დარღვევები, შაპერონის ცილების დისფუნქცია, ცილის აგრეგაციის და ბმის დარღვევები, არხის დისფუნქცია და სხვა.

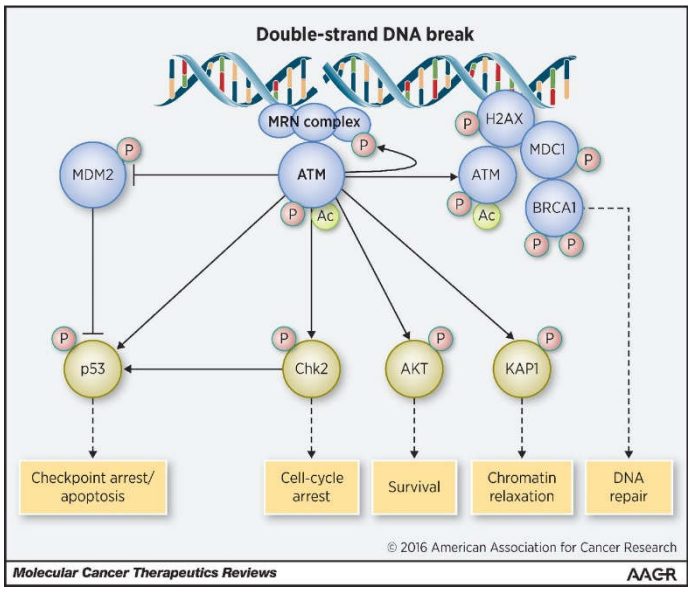
ATM გენი დამუტაცია

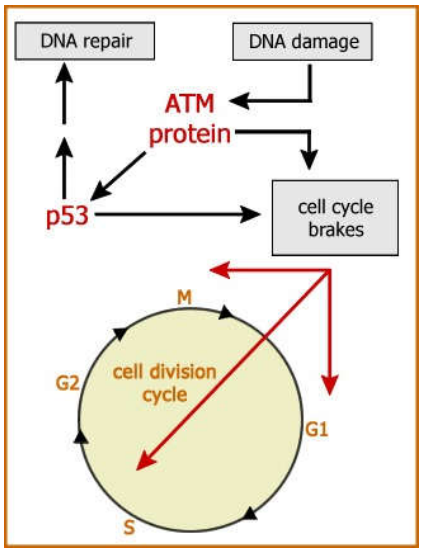
ლუი-ბარის სინდრომის პათოგენეზი დაკავშირებულია ATM გენის (ინგ. Ataxia Telangiectasia Mutated) მუტაციასთან, რომელიც წარმოადგენს სერინ-თრეონინ პროტეინკინაზას და მიეკუთვნება ფოსფატიდილინოზიტოლკინაზა(PIKK) ცილების ოჯახს. ATMგენი **(სურ.1)** მონაწილეობას ღებულობს უჯრედის დაყოფის პროცესის რეგულირებასა და აქტივაციის სიგნალების გადაცემაში. მოთავსებულია 11-ე ქრომოსომის გრძელ (q) მხარში q22.3 ლოკუსში. დაწარმოადგენს 150 kb სიგრძის თანმიმდევრობას და შედგება 66 ეგზონისაგან, კოდირებს ცილას, რომელიც 3056 ამიმომჟავისაგან შედგება.ATM გენის აქტივაციის მექანიზმი ჯერ კიდევ გაურკვეველია, თუმცა სავარაუდოა, რომ იგი ითვალისწინებდეს ფოსფორილირებას, ან კონფორმაციის ცვლილებას ქრომატინის სტრუქტურის ცვლილების საპასუხოდ დასხივების შედეგად.



სურ.1ATM გენის ლოკალიზაცია

ATM გენი აქტივირდება დნმ-ის ორძაფიანი წყვეტების საპასუხოდ. მისი აქტივაცია მოიცავს Chk2 ეფექტორული კინაზას ფოსფორილირებას, შემდეგ CDC25A კინაზას ფოსფორილირებას. შედეგად უჯრედში გროვდება ფოსფორილებული CDK2 ციკლინი, რომელიც იწვევს უჯრედული ციკლის ბლოკირებას. ასევე ხდება MDM2 და p53 ცილის ფოსფორილირებაც რაც იწვევს p53-ის სტაბილიზირებას (**სურ.2**). ეს იწვევს უჯრედული ციკლის შეჩერებას და აპოპტოზსაც კი.





სურ.2ATM გენის მოქმედების მექანიზმი

ატაქსია ტელეანგიექტაზიის ფენოტიპური გამოვლენა დაკავშირებულია ATM კინაზის სუბსტრატების დიდი რაოდენობით. ასევე აღინიშნება იმ ცილების გაზრდილი რაოდენობა, რომლების მონაწილეობენ დნმ-ის რეპარაციაში, აპოპტოზში, უჯრედული ციკლის რეგულაციაში, გენურ რეგულაციაში, ტრანსლაციის ინიციაციაში. აქედან გამომდინარე ATM დეფექტები მნიშვნელოვან ცვლილებებს იწვევს ორგანიზმში, ისეთების, როგორიცაა დნმ-ის დაზიანების არასწორი რეპარაციები და ასეთმა რეპარაციებმა შეიძლება სწორედ სიმსივნურ პროცესამდე მიგვიყვანოს. მუტაციები ATM გენში მოიცავს მისენს მუტაციებს და ჩარჩოშიდა დელეციებს მაკოდირებელ გენში.

სურ: 3 ატაქსია ტელეანგიექტაზიით დაავადებული ადამიანის კარიოტიპი

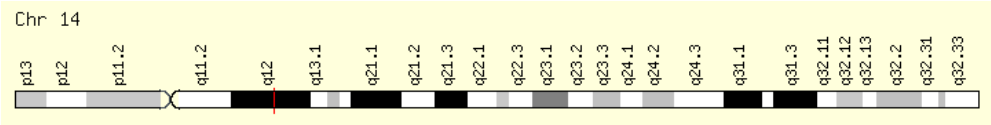
ნეიროდეგენერაციის გენეტიკური მექანიზმები

არსებობდა მოსაზრება იმის შესახებ, რომ ქრომოსომული არაასტაბილურობა შესაძლოა წარმოადგენდეს თავის ტვინის ნერვული უჯრედების დაზიანების მიზეზს, რომლების მიდრეკილი არიან ნეიროდეგენერაციისკენ, მათ შორის იგულისხმება ლუი-ბარის სინდრომით დაავადებული პაციენტების ნათხემის უჯრედები.

ამ მოსაზრების ექსპერიმენტალური დასაბუთების მიზნით ჩატარდა ლუი-ბარის სინდრომით დაავადებულიპაციენტების თავის ტვინის უჯრედების მოლეკულურ-ციტოგენეტიკურიკვლევა. კვლევის ობიექტს წარმოადგენდა ნათხემისა და ქერქის უჯრედები. ქრომოსომული გეპებისა და ანეუპლოიდიის შესწავლა ხორციელდებოდა მულტიპლექსური ფლუორესცენსიის *in situ* ჰიბრიდიზაციის მეთოდით (MFISH). ლუი ბარის სინდრომით დაავადებულთა თავის ტვინის გამოკვლევებმა აჩვენა, რომ ანეუპლოიდიის დონე თავის ტვინის ქერქსა და ნათხემში 2-5 ჯერ მაღალია საკონტროლო მონაცეებთან შედარებით. ამას გარდა, აღმოჩნდა, რომ 5-20 ჯერ იყო გაზრდილი ნათხემის ქსოვილში იმ უჯრედები რიცხვი, რომლების მე-14 ქრომოსომაში გეპებს შეიცავდნენ. ტვინის სხვა ნაწილებში ქრომოსომული გეპები არ დაფიქსირებულა. ICS-MCB მეთოდმა აჩვენა, რომ ლუი-ბარის სინდრომით დაავადებულთა ტვინის უჯრედებში გამოვლინდა გენომური არასტაბილურობის კონკრეტული მარკერები, ასოცირებული დნმ-ის რეპარაციული სისტემის დაღვევებთან, ქრომოსომების სეგრეგაციასთან და აპოპტოზთან. საბოლოო ჯამში შესწავლილი უჯრედების 5-15%-ში აღინიშნა არაშემთხვევითი ხასიათის ქრომოსომული გეპები მე-7, მე-14 და X ქრომოსომაში. ხოლო ნათხემის უჯრედების 40-70%-ში კი ანომალური ანეუპლოიდური ქრომოსომული ნაკრები და ქრომოსომული გეპები. იმუნო-FISH მეთოდმა აჩვენა, რომ უჯრედების დიდი ნაწილი (80%), რომელზეც ქრომოსომული არასტაბილურობა იქნა დაფიქსირებული შესაძლოა წარმოადგენდეს პურკინიეს უჯრედების წინამორბედებს, რომლების ატაქსია ტელეანგიექტაზიის დროს ნეიროდეგენერაციის სამიზნე უჯრედებს წარმოადგენს.

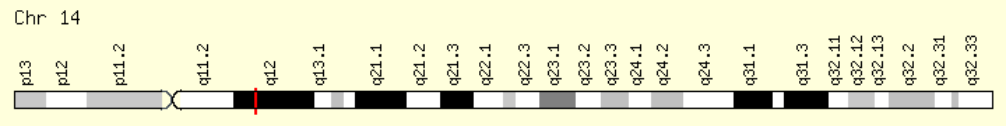
ICS-MCB (Interphase chromosome-specific multicolor banding) კარტირების მეთოდით შესაძლებელი იქნა იტერფაზულ ქრომოსომებში გეპების ადგილმდებარეობის იდენტიფიცირება. ეს უბნებია 7p14, 14q12, Xp22.1, Xp22.3. ბიოინფორამტიკის ტექნოლოგიების გამოყენებით (გენომური და ეპიგენეტიკური ანალიზის მონაცემთა ბაზა) დადგინდა, რომ 14q12 უბანში განლაგებული გენი კანდიდატები, რომლებიც შესაძლოა წარმოადგენდნენ ქრომოსომული არასტაბილურობის სამიზნეს ლუი-ბარის სინდრომის დროს არის FOXG1B

(ტრანსკრიპციის რეპრესიის ფაქტორი, რომელიც მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ტვინის რეგიონალური უბნების განვითარებასა და ტელენცეფალონის ჩამოყალიბებაში) (**სურ.4**) და NOVA1 (არეგულირებს რნმ-ის სპლაისინგს და მეტაბოლიზმსნეირონების დანვითარების გარკვეულ ეტაპზე) (**სურ.5**). ხოლო სხვა გენების ადგილას კი სპეციფიური მაკოდირებელი გენები არ მდებარეობს, თუმცა შეიცავენ ქრომოსომის ფრაგილური უბნებს, როგორიცაა FRA7C, FRAXB და FRAXC.აქედან გამომდინარე, AT (ATM) გენი შესაძლოა ახორციელებდეს ფრაგილური საიტების სტაბილურობას.



სურ. 4 FOXG1B გენის ლოკალიზაცია მე-14 ქრომოსომაში

მიღებული შედეგები ამტკიცებს, რომ ქრომოსომული არასტაბილურობის სელექტიური მოზაიკური ექსპრესია ნათხემის უჯედებში წარმოადგენს ნეიროდეგენერაციის მთავარ საფუძველს ლუი-ბარის სინდრომის დროს. მოლეკულური ციტოგენეტიკური და ბიოინფორმაციული ტექნოლოგიების კომპლექსის გამოყენება იძლევა ტვინის ნერვული უჯრედების გენომური არასტაბილურობის მონიტორინგისა და სამიზნე გენების რუკების შედგენის საშუალებას.



სურ. 5NOVA1 გენის ლოკალიზაცია მე-14 ქრომოსომაში

გამოყენებული ლიტერატურა:

- K. K. Khanna „Cancer Risk and the ATM Gene: a Continuing Debate“. Journal of the National Cancer Institute, Volume 92, Issue 10, 17 May 2000, Pages 795–802
- Sandoval N,Platzer M, Rosenthal A et al. “Characterization of ATM Gene Mutations in 66 Ataxia Telangiectasia Families”. Human Molecular Genetics, Volume 8, Issue 1, 1 January 1999, Pages 69–79
- Юров И.Ю. Тагирова М.К. Колотий А.Д. Ворсанова С.Г. Юров Ю.Б.„Генетические Механизмы Неиродегенерации: Исследование Геномной Нестабилъности В Нервных Клетках При Атаксии Телеангиэктазии (Синдром Луй-Бар)“. Успехи современного естествознания. – 2012. – № 3 – С. 89-89
- http://www.krasotaimedicina.ru/diseases/zabolevanija_neurology/louis-bar-syndrome
- https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FOXG1&keywords=FOXG1B
- http://mybiologyproject8.blogspot.com/