

УДК 000.00

ПОИСК ЯВЛЕНИЙ СОМАТИЧЕСКОЙ РЕКОМБИНАЦИИ В ГЕНЕ APP И АНАЛИЗ МЕХАНИЗМА ИХ ВОЗНИКНОВЕНИЯ НА ГЕНОМНОМ УРОВНЕ

Суханова К. В. (Лаборатория прикладной геномики, SCAMT, Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия)

Научный руководитель – к.б.н. Комиссаров А.С.

(Лаборатория прикладной геномики, SCAMT, Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия)

Аннотация.

Описание и предложение нового алгоритма поиска мишеней для ранней диагностики нейродегенеративных заболеваний, основанных на недавно обнаруженных явлениях соматической рекомбинации в нервных клетках. Применение заявленного алгоритма позволило обнаружить потенциальные маркеры в последовательности гена, ассоциированного с развитием болезни Альцгеймера.

Введение.

На сегодняшний день нейродегенерация – одно из самых тяжелых заболеваний. Согласно проведенным исследованиям установлено, что основной фактор развития нейродегенерации – нарушение сворачивания белка и приобретение специфической амилоидной структуры. Такая конформация представляет собой стабильную укладку белка в кросс-β-структуру, способствующую агрегации белка и потери функции.

Среди известных нейродегенеративных заболеваний, особый интерес представляет болезнь Альцгеймера. Данное заболевание вызывается приобретением белком бета-амилоидом (Aβ) амилоидной структуры и последующей агрегацией.

Современная система диагностики основана на уже идентифицированных генетических маркерах - мутациях в специфических генах: белок-предшественник амилоида (amyloid precursor protein, APP), презенелин 1, презенелин 2. Которые, действительно, приводят к неправильному фолдингу белков и последующей агрегации и амилоидизации.

Однако, несмотря на то, что патогенные мутации описаны, основанные на них методы терапии и диагностики не обладают высокой точностью и специфичностью. Таким образом, идентификация новых маркеров и разработка будущей диагностической системы является актуальной задачей 21 века.

Основная часть.

За последние два года несколько групп предложили идею нового механизма, участвующего в развитии нейродегенерации. Согласно результатам, полученным Джерольдом Чуном и Гвендолин Э. Кейз из Института медицинских открытий Сэнфорда Бернхема Пребиса в США, нейродегенерация может быть инициирована сложным событием, называемым соматической рекомбинацией. Как правило, это событие более специфично для продукции антител и реактивности иммунной системы. Однако Джерольд Чун определил, что в гене APP также возникают такие события, связанные с продукцией новых вариантов сплайсинга APP, состоящих из аномальных сочетаний экзонов, структурных единиц зрелого белка.

Хотя прорыв, сделанный лабораторией Джерольда Чуна, имеет важное значение для диагностики деменции, другая группа Ынджунг Элис Ли из Мэнтонского центра исследований орфанных заболеваний в США настаивает на загрязнении образцов Джерольда Чуна и, следовательно, на низкой достоверности и ложной положительности результатов.

Основываясь на этих выводах, объявленный исследовательский проект будет включать создание нового алгоритма поиска такой соматической рекомбинации в генах, связанных с дегенерацией, а именно в гене белка-предшественника амилоидов. Последующее выявление возможных механизмов таких событий и в перспективе – проверку патогенности соматически рекомбинантных вариантов с помощью транскриптомных данных из двух когорт людей: страдающие деменцией и здоровых.

Выводы.

Алгоритм предполагает более жесткую предварительную обработку данных и *in silico* создание экзон-экзонных сочетаний, которые впоследствии выравниваются на полный геном 21 хромосомы человека. Полученные результаты в дальнейшем используются для получения профилей распределения экзонных сочетаний и координат их инсерций для проверки ассоциации полученных профилей со структурной аннотацией генома. Из найденных сочетаний только наиболее часто встречающиеся идут в дальнейший анализ.

В случае обнаружения значимых ассоциаций и комбинаций мы получаем следующие важные результаты:

- 1) Корреляция распределений инсерций и структурных регионов генома позволит предположить возможный механизм исследуемых событий;
- 2) Наиболее часто встречающиеся комбинации будут анализированы на ответственность за продукцию патологических форм продукта гена APP и за развитие нейродегенерации с использованием транскриптомных данных;
- 3) В случае идентификации связи определенных экзонных сочетаний и патологических изоформ белка в перспективе будет предполагаться разработка праймеров для выявленных комбинаций и их использование в качестве маркеров для ранней диагностики.

На сегодняшний день, нами было идентифицировано, что лишь 5% всех возможных попарных комбинаций экзонов искомого гена имеют достаточно глубину покрытия генома 21 хромосомы. Причём наиболее частыми сочетаниями оказались парные сочетания экзона 7 с экзонами 6, 9, 10, соответственно. Для понимания причины такого частого и предпочтительного участия экзона 7 в сочетании нами также был проведён поиск аннотации и доменного описания закодированного искомым геном белка - β амилоида (A β). И согласно известным данным, именно экзон 7 участвует в формировании особого домена белка - Kunitz protease inhibitor domain, KPI - необходимого для инактивации сериновых протеаз.

Кроме этого, нами также было идентифицировано, что предпочтительные комбинации экзонов имеют не просто стохастическое распределение на геноме. Согласно проведённому корреляционному анализу с помощью теста Колмогорова-Смирнова мы обнаружили, что распределения мест инсерций исследуемых комбинаций статистически значимо (p -value < 0.05) коррелируют с распределениями таких структурных паттернов, как:

- V- и J-генетические сегменты;
- генетически кодирующие элементы;
- рекомбинационные факторы.

Такие результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. Соматическая рекомбинация действительно возникает в гене APP;
2. Рекомбинационные события APP затрагивают весь геном соответствующей хромосомы - 21 хромосомы человека;
3. Наиболее важными экзонными комбинациями являются:
 - a. Экзоны 7 и 6,
 - b. Экзоны 7 и 9,
 - c. Экзоны 7 и 10.
4. Аномальное перемещение 7 экзона может влиять на функциональность нейронов и провоцировать развитие нейродегенеративных заболеваний;
5. Соматические рекомбинации в гене APP вероятнее опосредованы следующими механизмами:
 - a. V-, J- опосредованные рекомбинации,
 - b. Рекомбинация вызванная горячими точками рекомбинации.

В дальнейшем планируется оценить патогенность найденных комбинаций с использованием транскриптомных данных. В случае доказательства последнего, будет возможен дизайн праймеров к описанным комбинациям с целью создания новых маркеров для диагностики и мишеней для терапии.

