Поиск мутаций в генах митохондриальной ДНК, ассоциированных с развитием болезни Альцгеймера, с использованием технологии параллельного секвенирования

Гольцов А.Ю., Андреева Т.В., Решетов Д.А., Тяжелова Т.В., Гаврик О.А., Рогаев Е.И.
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Научный Центр Психического Здоровья РАМН

Большинство спорадических случаев болезни Альцгеймера (БА) имеют неизвестную этиологию и характеризуются поздним началом. «Митохондриальная гипотеза» развития этого заболевания позволяет прояснить биохимические, генетические и патологические особенности развития таких случаев БА. Ранее было высказано предположение, что повреждения митохондриальной ДНК (мтДНК), возникающие в результате действия активных форм кислорода, могут быть основой механизмов клеточного старения [1]. Имея ограниченные возможности репарации, мтДНК более подвержена мутациям, в том числе из-за расположения в митохондриях в непосредственной близости к месту образования активных форм кислорода, что является предпосылкой к накоплению мутаций в мтДНК по мере старения [2].

Для поиска мутаций в мтДНК, ассоциированных с развитием болезни Альцгеймера, было проведено масштабное параллельное секвенирование с использованием геномного анализатора HiSeq2000 («Illumina») фрагментных библиотек, приготовленных из образцов геномной ДНК 8 пациентов с БА (71-85 лет) и долгожителя (105 лет). На основе полученных данных глубокого секвенирования был проведен анализ мтДНК в исследованных образцах. Среднее количество прочтений полной последовательносит мтДНК для каждого образца составило от 1000 до 3000, что является достаточным для биоинформационного анализа и поиска мутаций.

На первой стадии анализа все парноконцевые чтения были выровнены против референсного генома человека при помощи программы BWA [3] отдельно для каждого образца. На основе полученных данных с использованием пакета программ GATK (http://www.broadinstitute.org/gatk/) были предсказаны однонуклеотидные вариации и короткие делеции для каждого из просеквенированных образцов. В результате биоинформационного анализа данных глубокого секвенирования 11 образцов ДНК было выявлено 97 вариаций в последовательности мтДНК, при этом среднее число вариаций, выявленных в митохондриальном геноме каждого индивида у пациентов с болезнью Альцгеймера составило 20, у здорового индивида - 28. 20 вариаций были выявлены как у пациентов с БА, так и у долгожителя без признаков деменции, что позволяет предположить отсутствие их четкой роли в развитии БА. Из 69 вариаций, обнаруженных при анализе данных глубокого секвенирования только у пациентов с БА 14 были выявлены более, чем у одного пациента, что делает их потенциальными кандидатами для дальнейших исследований на расширенных выборках больных и здоровых индивидов для определения их возможной роли в развитии БА. Следует, однако, отметить, что результаты анализа данных глубокого секвенирования требуют обязательной верификации с использованием других методов, для исключения возможных ошибок, обусловленных самой методологией параллельного секвенирования.

Для анализа и верификации нами были выбраны вариации, которые функционально могут быть связаны с развитием болезни Альцгеймера, а именно, вариации, ведущие к аминокислотной замене, вариации в генах рибосомальных и транспортных РНК, а также новые вариации, выявленные нами в результате анализа данных глубокого секвенирования, которые в настоящее время не представлены в открытых базах данных. Анализ проводили с использованием коллекцию образцов пациентов с болезнью Альцгеймера (108 человек) и контрольной группы старше 70 лет из российской популяции (84 человека). От каждого индивида или его родственника, ДНК которого была использована в работе, было получено информированное согласие на проведение исследований. Анализ проводили с помощью метода ПЦР-ПДРФ или секвенирования по Сэнгеру. В результате было подтверждено 6 из 7 выбранных для анализа вариаций: C150T, T3197C, G5460T, G14858A, C15904T, A15924G. Анализ ассоциаций, проведенный на ограниченных выборках из московского региона, позволил предположить возможную роль однонуклеотидной замены C150T в регуляторной области мтДНК и мутации G5460T в гене ND2, ведущей к аминокислотной замене Ala->Ser, в развитии болезни Альцгеймера. Для подтверждения полученных данных целесообразно проведение дополнительного анализа на обширных выборках пациентов с болезнью Альцгеймера и контрольных групп из различных популяций.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и образования Российской Федерации (ГК 16.512.11.2083, ГК 02.740.11.0854, Соглашение № 8053).

Литература:

1. Sultana R, et.al. Journal of Bioenergetics and Biomembranes. 2009;41:441–446.
2. Miquel J. Mutation Research. 1992;275:209–216.
3. Li H. Bioinformatics. 2009;25:1754-60.