

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 последовательности 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 коллекции 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.