

На правах рукописи

ЮДКИН ДМИТРИЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

**МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СИНДРОМА
ЛОМКОЙ X-ХРОМОСОМЫ**

1.5.3 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Кольцово – 2023

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный консультант: Графодатский Александр Сергеевич, доктор биологических наук, профессор, член.-корр. РАН, ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, заведующий отделом.

Официальные оппоненты: Гуляева Людмила Федоровна, доктор биологических наук, профессор, НИИМБ структурное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», руководитель лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза

Салина Елена Артёмовна, доктор биологических наук, профессор, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», главный научный сотрудник отдела молекулярной генетики растений

Рябчикова Елена Ивановна, доктор биологических наук, профессор, ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, главный научный сотрудник группы микроскопических исследований

Ведущая организация: ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Защита состоится « » 2023 г. в 09-00 на заседании диссертационного совета 64.1.001.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, тел.: +7(383) 363-47-10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, URL: <http://www.vector.nsc.ru>.

Автореферат разослан « » 20 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Непомнящих Т.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Заболевания, ассоциированные с ломкой X-хромосомой, так называемые фраксопатии, развиваются из-за экспансии повтора CGG, локализованного в промоторной области гена *FMR1* перед первым экзоном. В зависимости от размера повтора различают три основных аллеля этого гена: норма, премутация и полная мутация. К фраксопатиям относятся три заболевания: синдром ломкой X-хромосомы, синдром атаксии/тремора, ассоциированный с ломкой X-хромосомой, и синдром первичной овариальной недостаточности, ассоциированный с ломкой X-хромосомой. Синдром ломкой X-хромосомы, также называемый синдромом Мартина-Белл, является самой распространенной причиной наследственной умственной отсталости у человека после синдрома Дауна и встречается с частотой 1/4000-1/6000 (D'Hulst, Kooy, 2009). Природа развития синдрома связана с гетерохроматинизацией промоторной области гена *FMR1* из-за экспансии при полной мутации и, следовательно, прекращением экспрессии. Это приводит к полному отсутствию РНК-связывающего белка FMRP, который принимает важное участие в развитии нейронов в эмбриональном периоде. При синдромах, ассоциированных с премутацией, ген продолжает работать, но нарушается баланс мРНК и белка FMRP. Клинические симптомы в этом случае развиваются, как правило, с возрастом пациента. Премутация встречается с частотой 1/200-1/400 (Tassone et al., 2007). Наибольшее значение при премутации имеет риск передачи увеличенного повтора следующим поколениям, причем при такой передаче экспансия может увеличиться и премутантный аллель перейдет в полную мутацию (D'Hulst, Kooy, 2009).

По данным Всемирной организации здравоохранения, умственная отсталость имеет высокое социальное значение, так как в среднем в мире на каждого человека с данной патологией затрачивается порядка 1 миллиона долларов в течение его жизни. На сегодня методов лечения синдрома ломкой X-хромосомы не существует. Более того, профилактика данной патологии заключается лишь в анализе размера повтора у матери и прогнозе вероятной экспансии у ребенка.

Высокая распространенность фраксопатий, их социальное значение и сложная молекулярно-генетическая природа развития требуют значительных усилий научного сообщества для понимания механизмов развития патологий при этих заболеваниях и понимания связи этих патологий с молекулярно-генетическими нарушениями. Эффективность таких исследований позволит подойти к разработке как методов эффективной диагностики, так и методов профилактики и лечения этих заболеваний. Однако такие исследования сталкиваются с определенными трудностями, обусловленными сложностью развития заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой. Молекулярные изменения при развитии фраксопатий влекут за собой целый ряд изменений в организме пациента как на биохимическом, так и на молекулярно-генетическом и организменном уровнях. Поэтому исследование природы развития данных патологий подразумевает комплексный подход, который включает в себя как исследование мутации экспансии

самой по себе, так и исследование ее влияния на остроту симптомов, а также разработку средств диагностики и лечения, с учетом знаний о природе развития фраксопатий.

Существует такое явление, как соматическая экспансия (Telenius et al., 1994; Chong et al., 1995; Manley, et al., 1999; Tanaka et al., 1999; De Biase et al., 2007). Т.е. повтор CGG по природе своей нестабильности может меняться в течение жизни индивидуума, причем в разной степени и в разных направлениях в разных тканях. Понимание природы и механизмов соматической экспансии и соматического мозаицизма имеет важное прогностическое значение при работе с пациентами с фраксопатиями. Исследование корреляции количественных параметров функциональной взаимосвязи отделов головного мозга и количественных параметров соматической нестабильности у носителей разных аллелей гена *FMR1* позволит определить вклад молекулярно-генетических изменений в развитие симптомов фраксопатий, что крайне важно для прогноза развития течения заболеваний.

Одной из характеристик синдрома ломкой X-хромосомы является образование ломкого сайта FRAXA. Этот сайт характеризуется перетяжкой или разрывом и может приводить к потере дистального фрагмента хромосомы. Понимание природы образования этого ломкого сайта также позволит охарактеризовать еще один из аспектов развития патологии.

Кроме того, наличие ломкого сайта FRAXA является одним из диагностических признаков синдрома ломкой X-хромосомы. По ряду причин использование Саузерн-блот гибридизации и амплификации крайне GC-богатых матриц затруднено во многих медико-генетических консультациях. В этом случае оптимизация молекулярно-цитогенетического подхода, основанного на визуализации ломкого сайта FRAXA, позволит получить удобный и недорогой инструментарий диагностики синдрома ломкой X-хромосомы.

Одна из основных целей исследования природы фраксопатий – это разработка методов их лечения. Наиболее перспективными считаются ингибиторы ДНК-метилтрансфераз и ингибиторы деацетилаз гистонов (Tabolacci, Chiurazzi, 2013). Основная идея использования таких веществ – это реактивация подавленной экспрессии гена *FMR1* вследствие чего будет появляться определенное количество белка FMRP, что должно привести к смягчению симптомов либо вообще к восстановлению нормального фенотипа. Некоторые из таких ингибиторов являются одобренными медицинскими препаратами для борьбы с другими заболеваниями. Исследование их реактивирующей способности в отношении подавленной экспрессии гена *FMR1* позволит оценить возможность их использования как препаратов для борьбы с фраксопатиями.

Цели и задачи. Целью работы является комплексное исследование заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой как на молекулярно-генетическом уровне, так и на уровне функциональных изменений головного мозга, а также

оптимизация диагностических и терапевтических подходов для борьбы с этими патологиями.

Задачи:

1. Выявить особенности соматической экспансии повторов (CGG)_n у человека и модельных мышей, носителей премутации по гену *Fmr1*.

2. Установить зависимость функциональных изменений в головном мозге у пациентов с фраксопатиями от степени соматической нестабильности повтора CGG в промоторной области гена *FMRI*.

3. Построить молекулярную модель формирования ломких сайтов FRAXA на основе исследования механизма их образования у пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы.

4. Разработать подход для молекулярной визуализации ломкого сайта FRAXA на хромосомах пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы.

5. Оценить эффективность использования ингибиторов гистоновых деацетилаз, одобренных для применения в клинической практике, как потенциальных терапевтических агентов для лечения фраксопатий.

Научная новизна. В работе впервые показано, что соматическая экспансия повтора CGG у модельных мышей различна в различных органах и зависит от возраста. Предложена схема расчета индекса соматической нестабильности для повтора CGG.

Впервые предложен подход молекулярно-цитогенетической визуализации ломкого сайта FRAXA с использованием двух зондов для флуоресцентной гибридизации *in situ*. Достоверность этого подхода подтверждена статистической значимостью отличий между пациентами и носителями нормального аллеля. Подход использован для исследования большой выборки пациентов с подозрением на синдром ломкой X-хромосомы.

На основе данных локализации ориджинов репликации и выявленной недорепликации промоторной области гена *FMRI* предложена и обоснована модель, описывающая образование редких ломких сайтов хромосом, на примере сайта FRAXA.

Впервые исследовано влияние ромидепсина и вориностата, ингибиторов деацетилаз гистонов, на реактивацию гена *FMRI* в культуре клеток человека.

Теоретическая и практическая значимость исследований. Представленная работа имеет как теоретическую, так и практическую значимость.

Полученные данные о соматической нестабильности и природе ломкого сайта FRAXA значительно расширяют понимание механизмов развития заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, и могут быть использованы при разработке новых методов для диагностики и терапии этих заболеваний. Индекс соматической нестабильности может быть использован при клиническом обследовании пациентов для прогнозирования остроты симптомов и риска передачи увеличенного аллеля.

Разработанный подход для визуализации ломкого сайта FRAXA был успешно применен для постановки диагноза пациентам, обратившимся в ГБУЗ Новосибирской области «Городская клиническая больница №1». Всего обследовано более 200 пациентов из Новосибирской области.

Данные по влиянию ингибиторов деацетилаз гистонов на реактивацию гена *FMRI* вносят вклад в разработку методов лечения заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, и позволяют исключить неперспективные мишени при поиске подходящего препарата.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Соматическая экспансия повтора CGG наблюдается как у мышей, носителей премутации по гену *Fmr1*, так и у пациентов с фраксопатиями. Уровень соматической экспансии отличается в различных органах и тканях и не зависит от уровня репликации и транскрипции локуса.

2. Визуализация ломкого сайта FRAXA с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации с последовательностями генов *FMRI* и *GPR50* после обработки клеток 5-фтордезоксифуридином позволяет достоверно выявлять этот ломкий сайт и может быть использована для диагностики синдрома ломкой X-хромосомы.

3. В промоторной области гена *FMRI* В-лимфоцитов человека расположена зона активации репликации, представленная тремя ориджинами репликации. В клетках с полной мутацией подавлена активность основного ориджина, что является причиной ломкости хромосом в сайте FRAXA. Таким образом, этот ломкий сайт не является артефактом, а представляет собой результат недорепликации участка хромосомы.

4. Ингибиторы деацетилаз гистонов не могут являться реактиваторами экспрессии гена *FMRI* и рассматриваться как потенциальные терапевтические агенты для борьбы с синдромом ломкой X-хромосомы.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на следующих конференциях: (1) 13-я Международная конференция по ломкой X-хромосоме (13th International Fragile X Conference), 25-29 июля, 2012 (Майами, США); (2) Научная конференция «Фундаментальные науки – медицине: Актуальные проблемы молекулярной медицины», 16-20 сентября, 2013 (Новосибирск); (3) Международная конференция «Хромосома 2015», 24-28 августа, 2015 (Новосибирск); (4) Международная конференция Европейской молекулярно-биологической лаборатории: Персонализированная медицина (EMBL/Stanford Conference: Personalized Health), 16-19 ноября, 2015 (Гейдельберг, Германия); (5) 12-й Международный конгресс по клеточной биологии (12th International Congress of Cell Biology), 21-25 июля, 2016 (Прага, Чехия); (6) 50-я конференция Европейского общества генетики человека (50th European Society of Human Genetics Conference), 27-30 мая, 2017 (Копенгаген, Дания); (7) Международная конференция «Хромосома 2018», 20-24 августа, 2018 (Новосибирск); (8) 52-я конференция Европейского общества генетики человека (52th European Society of Human Genetics Conference), 15-18 июня, 2019 (Гетеборг, Швеция); (9) 53-я конференция Европейского общества

генетики человека (53th European Society of Human Genetics Conference), 6-9 июня, 2019 (виртуальная).

Публикации по теме диссертации. По материалам диссертационной работы опубликовано 20 статей в изданиях, включенных в перечень ВАК ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук.

Личный вклад автора. Постановка задач, планирование экспериментов, написание научных трудов выполнено автором лично. Большая часть молекулярно-генетических исследований проведена автором лично либо в составе коллектива. Исследования соматической нестабильности повтора CGG в промоторной области гена *FMRI* в тканях лабораторных мышей, культурах клеток и головном мозге человека, разработка подхода для визуализации ломкого сайта FRAXA и исследование механизма образования этого сайта проведены в секторе хромосомных патологий ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН совместно с сотрудниками секции структуры гена и заболеваний Национального института диабета и заболеваний пищеварительной системы и почек Национальных институтов здоровья (NIDDK, NIH, США) д-р К. Асдин, д-р Д. Кумари и Р.А. Локанга. В работе по анализу ориджинов репликации *in silico* принимала участие д-р М.И. Аладжем.

Работы по сбору и анализу образцов пациентов с фраксопатиями проведены совместно с ГБУЗ Новосибирской области «Городская клиническая больница №1». Клинический осмотр и отбор пациентов проведен врачами – медицинскими генетиками д.м.н., проф. Максимовой Ю.В. и Шориной А.Р. Работы по фМРТ головного мозга пациентов проведены д.м.н., проф. Тулуповым А.А. (ФГБУН Институт «Международный томографический центр» СО РАН). Все остальные молекулярно-генетические исследования проведены в секторе хромосомных патологий ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН и отделе геномных исследований ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора.

Представленное исследование на разных этапах поддержано грантами Российского научного фонда № 15-15-10001 и № 18-15-00099, а также грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 18-29-07033.

Автор выражает благодарность к.б.н. Дольскому А.А., к.б.н. Грищенко И.В., к.б.н. Лемской Н.А., Шитик Е.М. и всем сотрудникам сектора хромосомных патологий ФГБУН ИМКБ СО РАН и отдела геномных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора за неоценимую помощь в проведении молекулярно-биологических работ. Автор благодарен д.м.н., проф. Максимовой Ю.В., Шориной А.Р. (ГБУЗ Новосибирской области «Городская клиническая больница №1») и д.м.н., проф., член.-корр. РАН Тулупову А.А. (ФГБУН Институт «Международный томографический центр» СО РАН) за плодотворное сотрудничество.

Также автор выражает благодарность д.б.н. Кочневой Г.В., д.б.н. Карпенко Л.И. (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) и д.б.н., проф. Дымшицу Г.М. (структурное подразделение Новосибирского государственного университета – СУНЦ НГУ) за ценные советы и замечания при подготовке рукописи.

Автор выражает благодарность своему научному консультанту, чл.-корр. РАН, д.б.н., проф. Графодатскому А.С. за неоценимую помощь и советы при написании этой работы.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация изложена на 249 страницах машинописного текста, включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение собственных исследований, заключение, выводы, список литературы, содержащий 466 работ отечественных и зарубежных авторов, приложения. Диссертация иллюстрирована 8 таблицами и 38 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

Глава содержит подробное описание природы и механизмов развития заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой. Описано участие микроРНК, эпигенетических механизмов и RAN-трансляции в формировании патологии при данных заболеваниях. Подробно рассмотрены причины и механизмы соматической нестабильности тринуклеотидных повторов и существующие методы ее оценки. Приведены данные по типам, структуре и механизмам формирования ломких сайтов хромосом. Описаны методы диагностики и терапии фраксопатий.

Глава 2. Материалы и методы

Материалы. Использованы трансгенные мыши с премутацией по гену *Fmr1* (Entezam et al., 2007), биоматериал пациентов из NICHD Brain and Tissue Bank for Developmental Disorders (Банк головного мозга и тканей пациентов с нарушениями развития, США), пациенты с фраксопатиями из ГБУЗ Новосибирской области «Городская клиническая больница №1», а также линии В-лимфоцитов из клеточного репозитория Института медицинских исследований Кориелла (США) и полученные в рамках данной работы.

Лабораторные мыши содержались в питомнике лабораторных животных NIH в соответствии с «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals». Работы с животными проводили в согласовании с NIDDK Animal Care and Use Committee (Комитет по содержанию и использованию животных Национального института диабета, заболеваний почек и пищеварительной системы).

Процедура обследования пациентов и здоровых лиц с целью получения необходимого материала всегда начиналась с беседы, в которой пациент или его опекун подробно ознакомился с целью научного проекта, предстоящей ему программой обследования и значимостью полученных результатов. Процедура привлечения к обследованию была построена строго в соответствии с международными требованиями, которые включают в себя: информированность

обследуемого, его согласие на проведение обследования в полном объеме и обеспечение конфиденциальности. В случаях, когда обследуемый являлся несовершеннолетним, подобную процедуру получения информированного согласия проводили с его родителями. Все исследования соответствовали этическим стандартам, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной Медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Кроме того, исследования проводились под контролем локальных этических комитетов ГБУЗ Новосибирской области «Городской клинической больницы №1», ФГБУН Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, ФГБУН Института «Международный томографический центр» СО РАН.

Методы. Подробно описаны методики работы с различными типами клеток, использованных в работе, молекулярно-цитогенетические методики для выявления ломких сайтов. Приводится детальное описание подходов для анализа ориджинов репликации, определения уровней экспрессии гена *FMR1* как на уровне РНК, так и на уровне белка, а также определения длины повтора CGG. Отдельно представлены подходы для обработки клеток ингибиторами и краткое описание фМРТ.

Глава 3. Соматическая нестабильность повтора CGG и ее влияние на проявление фраксопатий

Соматическая экспансия в различных органах мышей с премутацией по гену *Fmr1*. Для получения детальных данных о соматической экспансии CGG-повтора в различных органах мышей определяли его размер у самцов различных возрастов модельной линии. Приблизительная исходная длина повтора составляла около 130 триплетов. Полученные профили размеров повторов при отсутствии мозаицизма обычно имели распределение Гаусса, в котором продукты отличались на один триплет. Максимальное количество продукта считали основным аллелем в исследуемом образце ДНК. В случае экспансии или сокращения размера повтора профиль распределения продукта отличался от распределения Гаусса смещением вправо или влево, более широким распределением или появлением дополнительных продуктов.

В результате в раннем постнатальном периоде жизни мышей показана низкая соматическая экспансия либо ее полное отсутствие. В возрасте 12 месяцев соматическая экспансия наблюдалась у всех исследованных животных и наиболее ярко проявлялась в головном мозге, печени и семенниках. Относительно низкий уровень экспансии выявлен в почках, что отличается от данных, показанных ранее для других заболеваний, обусловленных экспансией повторов. В сердце и крови была очень низкая соматическая экспансия, даже у мышей возрастом более 12 месяцев. Для большей наглядности рассчитывали индекс соматической нестабильности по методике Ли с соавторами (Lee et al., 2010) для каждого органа (рис. 1).

В головном мозге мышей средний уровень экспансии оказался меньше, чем, например, в печени, но в то же время разные отделы головного мозга показали разный профиль экспансии. Так, например, в таламусе она минимальна, в то время как в полосатом и миндалевидном телах экспансия была более выражена и составила 6 и 8 триплетов соответственно.

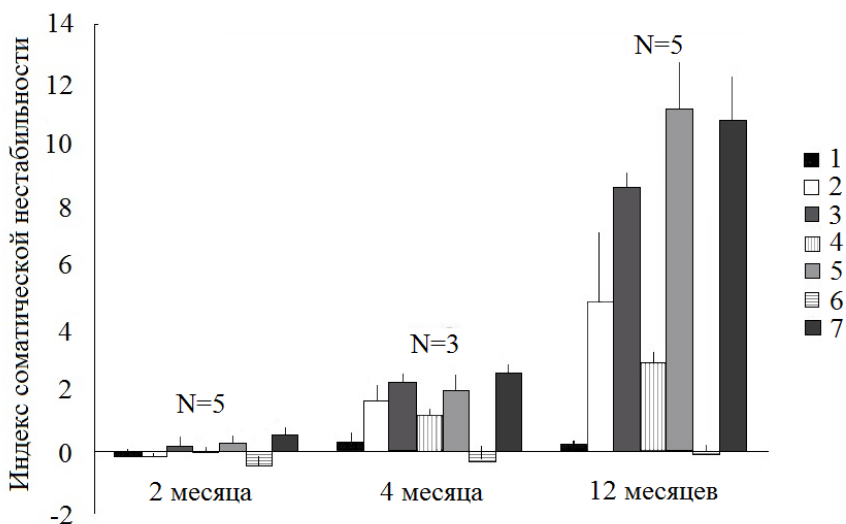


Рисунок 1. Индекс соматической нестабильности в различных органах мышей с премутацией по гену *Fmr1* и исходным размером CGG-повтора 141-145 триплетов.

1 – хвост в 3-недельном возрасте для сравнения, 2 – хвост на момент исследования, 3 – головной мозг, 4 – почки, 5 – печень, 6 – сердце, 7 – семенники. N – количество исследованных животных. Вертикальные отрезки отображают доверительные интервалы.

Экспансия (CGG)n-повтора в несоматических клетках семенников. Анализ профиля распределения размера повторов в сперме 12-месячных мышей с премутацией по гену *Fmr1* показал, что он отличается от такового в целых семенниках тех же самых животных. В сперме наблюдался единственный пик, который превышал исходный аллель на 5 триплетов, в то время как в семенниках было два пика, один из которых соответствовал исходному аллелю, а второй превышал его на 13 повторов. Что касается семенников 11-месячных самцов мышей, там наблюдалась очевидная экспансия как во фракции, обогащенной первичными сперматоцитами, так и во фракции, обогащенной сперматогониями. Однако во фракции соматических клеток семенников экспансия не наблюдалась. Также экспансии не было в соматических и половых клетках неполовозрелых модельных мышей 18-дневного возраста. Этот результат свидетельствует в пользу того, что экспансия не происходит в примордиальных половых клетках или просперматогониях, но начинает накапливаться в половых клетках половозрелых мышей в процессе сперматогенеза.

Соматическая экспансия и метаболизм ДНК. Причины экспансии повторов связывают с нарушениями при различных процессах метаболизма ДНК, таких как репликация, транскрипция или репарация. Поскольку уровень соматической

экспансии различен в разных органах, предполагается существование возможной связи между размером экспансии и пролиферативной активностью клеток. Печень – это орган, для которого показан наивысший уровень экспансии. Однако в клетках печени взрослых грызунов крайне редко происходят клеточные деления и события синтеза ДНК (Bohman et al., 1985). Аналогично высокий уровень экспансии показывает головной мозг, поскольку он содержит в большой пропорции слаборастущую глию и неделящиеся нейроны. Таким образом, не наблюдается какой-либо корреляции между степенью экспансии и пролиферативной активностью клеток.

Второй фактор, который, вероятно, может влиять на соматическую экспансию, это активная транскрипция гена, в котором локализован повтор. Был измерен уровень мРНК гена *Fmr1* в различных органах мышей с премутацией по этому гену. В итоге можно установить, что уровень транскрипции сам по себе не объясняет уровень экспансии. Так, количество мРНК *Fmr1* низкое в сердце при низком уровне экспансии в этом органе. Однако уровень мРНК в почках намного выше, чем в печени, притом что экспансия в печени выше (рис. 2). Следовательно, нельзя установить прямую связь между уровнем экспрессии гена *Fmr1* и уровнем экспансии.

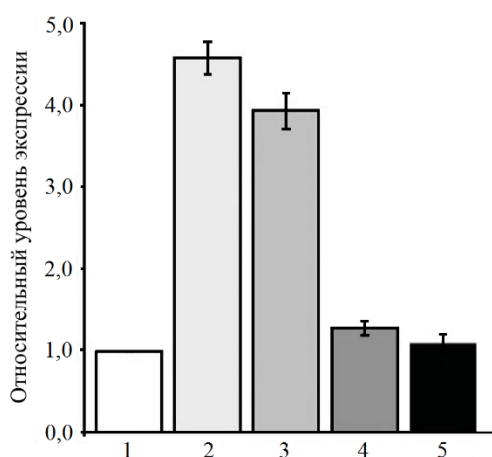


Рисунок 2. Уровень экспрессии гена *Fmr1* у лабораторных мышей, носителей премутации в различных органах относительно уровня экспрессии в сердце.

1 – в сердце, 2 – в головном мозге, 3 – в почках, 4 – в печени и 5 – в семенниках. Результаты рассчитаны относительно уровня экспрессии гена *Fmr1* в сердце. Вертикальные отрезки отображают доверительные интервалы.

Третий фактор метаболизма ДНК, который, вероятно, влияет на соматическую экспансию, – это репарация. Ранее было показано, что белки мисматч-репарации *Msh2* и *Msh6*, которые формируют комплекс *MutS β* , участвуют в экспансии повторов в мышечных моделях миотонической дистрофии I типа и болезни Хантингтона (Manley et al., 1999; Wheeler et al., 2003; Foiry et al., 2006; Tome et al., 2009). Проводилось сравнение непосредственно уровней этих белков с величиной экспансии в сердце, головном мозге, печени, почках и семенниках. Головной мозг и

семенники – органы с высоким уровнем экспансии – имеют высокий уровень Msh3. Это должно согласоваться с идеей о том, что уровень Msh3/MutSβ определяет склонность этих органов к экспансии. Однако факт того, что сердце, почки и печень имеют сходный уровень Msh3, не поддерживает указанную гипотезу, так как все эти органы имеют абсолютно разный уровень экспансии.

Соматическая экспансия в культурах В-лимфоцитов и головном мозге человека. Соматическая экспансия, наблюдаемая у мышей с премутацией по гену *Fmr1*, свидетельствует о возможной аналогичной картине в клетках человека. В нашей коллекции имелись выделенные в разные периоды времени в течение 42 месяцев образцы ДНК премутантной линии иммортализованных В-лимфоцитов человека GM06891 с исходным размером CGG-повтора 118 триплетов (рис. 3А, Г). Образцы ДНК, выделенные после двух лет периодического культивирования, содержали очень малое количество исходных аллелей. В них преобладали аллели на 16, 35 и 51 триплет превышающие исходный (рис. 3Б, Г). В более поздних образцах преимущественно представлен аллель размером 195 триплетов, что на 77 повторов больше исходного. Также присутствует небольшое количество аллелей, превышающих исходный на 45, 62, 93-96 триплетов (рис. 3В, Г).

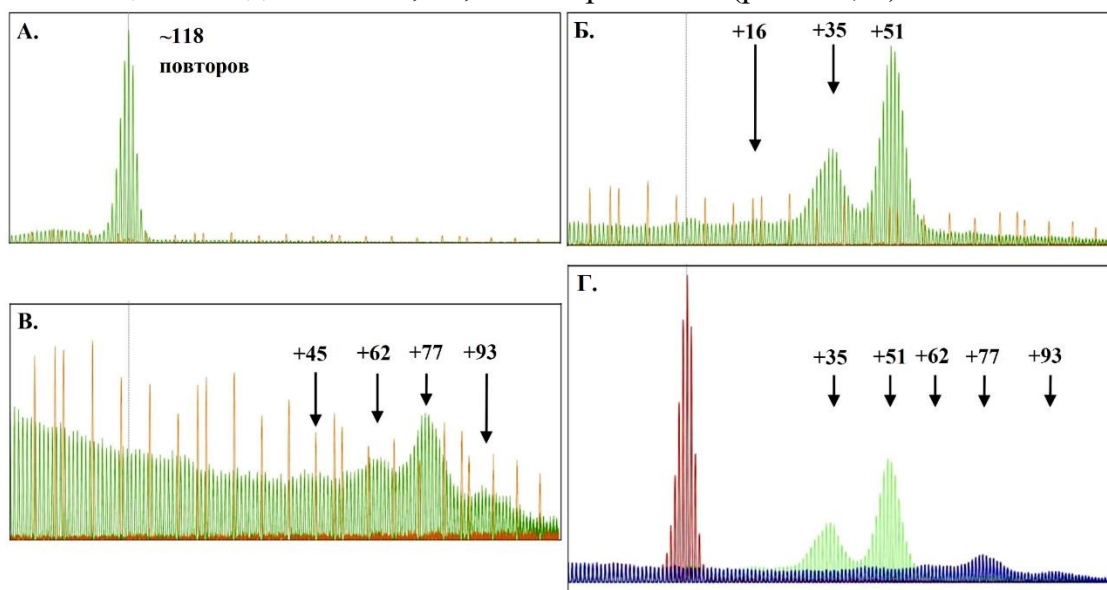


Рисунок 3. Соматическая экспансия в культуре В-лимфоцитов человека с премутацией по гену *FMRI*.

А – размер CGG-повтора в культуре клеток GM06891 непосредственно после получения ее из клеточного хранилища; Б и В – размер CGG-повтора в той же линии клеток, но в двух более поздних временных точках; Г – наложение всех трех временных точек в одном масштабе.

+X – количество повторов относительно исходного аллеля. Вертикальная пунктирная линия указывает на исходный размер аллеля.

Основные изменения выявлены в миндалевидном теле. Там обнаружено присутствие незначительного количества аллелей, на 13 повторов превышающих по размеру исходный. Префронтальная кора показала незначительное смещение основного пика на один повтор в сторону увеличения. Также был небольшой пик, соответствующий аллелю на 8 триплетов больше исходного, и совсем маленький

пик, незначительно превышающий фон. Его размер был на 19 триплетов больше, чем наблюдалось в крови. Происходит ли экспансия во всех этих регионах или в отдельных клеточных популяциях из этих отделов мозга, остается неясным.

Влияние соматической экспансии CGG-повторов на изменения в головном мозге человека и нарушение когнитивных функций. По методике Ли с соавторами (Lee et al., 2010) индекс соматической нестабильности рассчитывается исходя из значения величины основного аллеля и разброса значений размеров остальных аллелей. В случае повтора CGG, так как нельзя выделить ни основной, ни исходный аллель, за центральное значение решено принять медиану всех значений. В этом случае нестабильность будет тем выше, чем сильнее отклоняются крайние значения размеров аллелей от медианы и чем больше количество аллелей. Таким образом, для CGG-повтора, локализованного в промоторной области гена *FMR1*, оптимальным будет расчет индекса соматической нестабильности (I_{SI}) по следующей формуле:

$$I_{SI} = Me \times (N_{max} - Me),$$

где Me – медиана значений размеров повторов во всех аллелях данного образца, а N_{max} – максимальная длина CGG-повтора в исследуемом образце. Медиана – это величина, которая позволяет разделить все множество значений аллелей на две равные части. При этом учитывается гетерогенность генотипа и количество аллелей в образце и не имеет значения представленность ПЦР-продукта. Таким образом не требуется эффективного синтеза каждого аллеля в ПЦР, достаточно того, чтобы каждый аллель был детектирован и учтен исследователем.

С использованием разработанного подхода была проанализирована соматическая нестабильность в выборке пациентов из медико-генетической консультации ГБУЗ НСО «Городская клиническая больница №1». Для работы отбирали тех пациентов, для которых были получены результаты фрагментного анализа размера повтора и была сделана функциональная МРТ головного мозга. Выборка состояла из 11 пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы и 15 матерей пациентов. Мозаицизм по размеру повтора был выявлен у 9 пациентов из 11. У 8 пациентов из 9 с мозаичным генотипом был выявлен нормальный аллель. Два аллеля было детектировано у 4-х пациентов, 3 и 4 аллеля – у двух и 5 аллелей – у одного из носителей мозаичного генотипа. Среди матерей пациентов 5 были гомозиготами с нормальным размером повтора, 4 были гетерозиготны, одна из них имела аллели, соответствующие норме/серой зоне, остальные имели норму/премутацию. Оставшиеся 6 матерей пациентов были мозаичны, с 3 или 4 аллелями размером от нормы до премутации и с полной мутацией в одном случае.

Когнитивные способности в первую очередь зависят от взаимодействий между популяциями нейронов и отделами головного мозга – функциональной коннективности (ФК) (Sporns, 2013). Исследование ФК в различных долях головного мозга заключается в комплексном подходе, обеспечивающем как структурные, так и функциональные доказательства взаимосвязи между областями головного мозга, которые определяют основу когнитивных процессов. Для оценки взаимодействий

между отделами головного мозга проводили исследование ФК с помощью функциональной МРТ в состоянии покоя (resting state). Было установлено, что соматическая нестабильность повтора CGG в гене *FMR1* влияет именно на функциональную коннективность в головном мозге у пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы.

Установлено, что для ряда функциональных коннективностей между отделами головного мозга существует зависимость от соматической нестабильности CGG-повтора, а между матерями и пациентами есть отличия.

Биологический смысл корреляций между индексом соматической нестабильности и функциональной коннективностью между отделами головного мозга. В данной работе представлены результаты по исследованию нестабильности CGG-повтора у трансгенных лабораторных мышей, несущих премутантный аллель. Обнаружено, что изменения повтора происходят в разных органах в разной степени, но значительно проявляются именно с возрастом животного. При этом нет корреляции с репликативной активностью, уровнем транскрипции гена *Fmr1* и уровнем экспрессии белков репарации Msh2, Msh3 и Msh6. Значительная экспансия наблюдается в половых клетках, что обуславливает передачу увеличенного повтора по отцовской линии. При работе с образцами человека возможен анализ посмертного материала тканей. В нем выявлено увеличение размера повтора в различных отделах головного мозга относительно такового в крови. Тут следует упомянуть, что в случае модельных мышей в крови изменения размера повтора также незначительны. Это следует учитывать при работе с образцами крови пациентов. Наблюдаемая нестабильность размера повтора в образцах венозной крови будет подразумевать ее наличие в меньшей степени в головном мозге. Таким образом, анализ корреляций соматической нестабильности в крови с функциональной коннективностью отделов головного мозга имеет значение.

Также был проведен анализ функциональной коннективности между отделами головного мозга пациентов с помощью функциональной МРТ. Измеряли уровень коактивации при фМРТ в покое. Для определения того, влияет ли размер CGG-повтора на когнитивные функции, были исследованы корреляции индексов соматической нестабильности с изменениями функциональных коннективностей в головном мозге пациентов и их матерей. В большинстве случаев у матерей с достоверными изменениями функциональных коннективностей была отрицательная корреляция функциональной коннективности и индексов соматической нестабильности, т.е. чем выше была соматическая нестабильность, тем ниже функциональная коннективность между отделами головного мозга. У пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы была обратная связь: высокая соматическая нестабильность коррелировала с высокой функциональной коннективностью. С молекулярно-биологической точки зрения это можно объяснить тем, что все матери пациентов с высокой соматической нестабильностью имели только премутантные аллели, в то время как низкая соматическая нестабильность сопряжена с нормальными аллелями. В то же время у пациентов высокая соматическая

нестабильность начинала проявляться при появлении нормального аллеля при полной мутации, что приводило к смягчению симптомов. Важно отметить две корреляции в группе матерей и пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы, которые затрагивают правую островковую долю и нижнюю лобную извилину, а также нижнюю лобную и переднюю поясную извилины. Эти области регулируют эмоции и внимание и играют роль в когнитивных и мотивационных функциях (Cha et al., 2016; Namkung et al., 2017). Кроме того, островковая доля влияет на сеть, лежащую в основе социальных когнитивных процессов, и сеть, ответственную за манипулирование информацией и принятие решений (Uddin et al., 2017). Вероятно, изменения в островковой доле, нижней лобной и передней поясной извилине отвечают за развитие аутистических симптомов, которые характерны для пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы. Таким образом, индекс соматической нестабильности является применимым критерием для количественной оценки степени вариабельности CGG-повторов и коррелирует с изменениями в головном мозге пациентов.

Глава 4. Разработка подхода для визуализации ломкого сайта FRAXA на препаратах метафазных хромосом

Паттерны локализации сигналов генов *FMRI* и *GPR50*. Ломкий сайт FRAXA является индуцируемым фолатчувствительным и детектируется после инкубации делящейся клеточной линии в присутствии 5-фтордезоксипуридина. После индукции FRAXA готовили препараты метафазных хромосом и проводили их гибридизацию *in situ* с двумя зондами, мечеными разными флуорохромами, позволяющими их идентифицировать на препарате. В качестве зондов использовали ВАС-клоны, один из которых содержал полную последовательность гена *FMRI* (RP11-489K19), а второй – полную последовательность гена *GPR50* (RP11-351H6).

Основной проблемой визуализации именно сайта FRAXA, а не соседних ломких сайтов, с помощью методов классической цитогенетики является его теломерное положение на хромосоме. Из-за этого исследователь достаточно просто может идентифицировать перетяжку. Однако, если происходит разрыв и теломерный фрагмент теряется, незначительная разница в длине хроматид не позволяет с помощью микроскопа установить наличие разрыва. Использование флуоресцентной гибридизации *in situ* может помочь более эффективно выявлять наличие теломерного фрагмента, а вероятные трудности тут могут возникать только из-за проблем гибридизации. Идея использования двух зондов позволяет: во-первых, маркировать ломкий сайт в гене *FMRI*, во-вторых, маркировать теломерный фрагмент, который теряется и в котором расположен ген *GPR50*, и, в-третьих, свести к минимуму проблемы гибридизации одного из зондов использованием второго зонда.

Всего в ходе выполнения этой работы было проанализировано более 1000 метафазных пластинок в 4-х клеточных линиях: двух, полученных от здоровых индивидуумов, и двух, полученных от пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы. Для контроля проводили анализ наличия ломких сайтов FRAXA в тех

же самых клеточных линиях, только без обработки 5-фтордезокситурином. Всего было выделено 5 паттернов распределения сигналов от двух зондов на препаратах метафазных хромосом (рис. 4). Все локализации сигналов на нормальных X-хромосомах без ломких сайтов отнесены к паттернами I-III (см. рис. 4). Во всех этих типах локализации при окрашивании DAPI не наблюдается каких-либо разрывов или перетяжек. Паттерн I представляет собой четкие сигналы на двух хроматидах от двух используемых зондов. При паттерне локализаций II сигнал одного из зондов на одной из хроматид теряется, при этом виден четкий сигнал двух зондов на двух хроматидах. Паттерн локализации III характеризуется потерей обоих сигналов от одного из зондов и сохранением двух сигналов второго зонда. Именно паттерны II и III объясняют использование двух зондов. Потеря сигнала в них связана не с отсутствием необходимых последовательностей в хромосоме, а с трудностями гибридизации, обусловленными, например, недостаточной протеиназной обработкой конкретного участка хромосомы, что снижает доступность ДНК для гибридизации. Паттерны локализаций IV и V (см. рис. 4) отнесены к аномальным, то есть характерным для хромосом, несущих ломкий сайт FRAXA. Так, паттерн IV представляет собой сигналы от одного или двух зондов на одной из хроматид и полное отсутствие сигналов на второй. При этом на DAPI-окрашенных хромосомах никаких разрывов или перетяжек может не наблюдаться. Паттерн V характеризуется разрывами или перетяжками, видимыми при DAPI-окрашивании. При этом не имеет значения, каким образом распределены сигналы от обоих зондов.

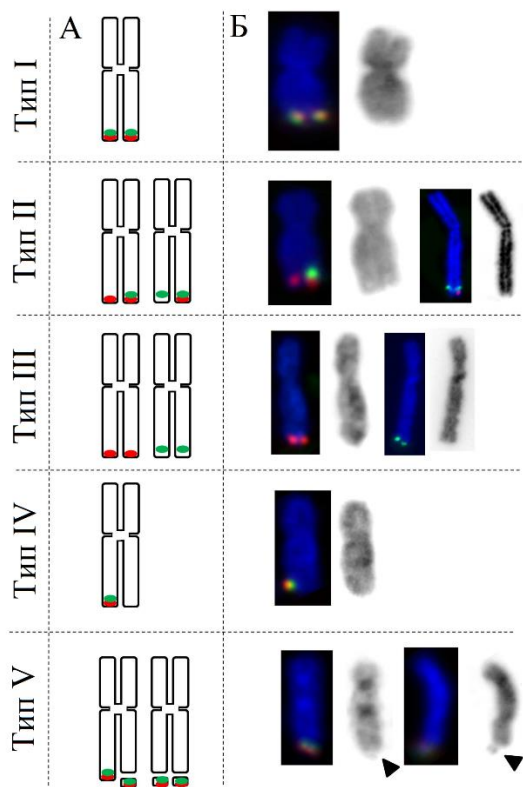


Рисунок 4. Типы паттернов локализации ВАС-клонов, несущих гены *FMRI* (зеленый) и *GPR50* (красный) на метафазных хромосомах пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы и здоровых контролей.

А – схема; Б – примеры FISH-изображений для каждого паттерна локализаций; синий цвет хромосом – за счет окрашивания DAPI; справа от каждой фотографии – инвертированное черно-белое DAPI-изображение для более детального анализа морфологии X-хромосомы; стрелками указаны видимые разрывы или перетяжки на хромосомах.

Распределения паттернов локализации в зависимости от клеточной линии и наличия или отсутствия 5-фтордезоксисуридина. Распределение паттернов локализации было исследовано в двух контрольных клеточных линиях – GM06865 и GM06895; и двух линиях клеток, полученных от пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы, – GM03200 и GM04025. Выбранные культуры клеток инкубировали в присутствии 5-фтордезоксисуридина либо без него, после чего фиксировали, получали препараты метафазных хромосом и проводили гибридизацию *in situ* с описанными выше зондами. После этого подсчитывали паттерны локализации сигналов во всех вариантах клеток. Анализировали не менее 100 метафазных пластинок для каждой линии клеток и каждого варианта инкубации. Результаты подсчета паттернов локализации представлены в таблице 1.

Таблица 1. Частота паттернов локализации ВАС-клонов, несущих гены *FMR1* и *GPR50* на метафазных хромосомах пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы и здоровых контролей.

Тип паттерна	GM06895		GM06865		GM03200		GM04025	
	К	FdU	К	FdU	К	FdU	К	FdU
Норма								
I	0,84	0,85	0,88	0,83	0,89	0,73	0,87	0,77
II	0,09	0,10	0,06	0,11	0,05	0,03	0,07	0,05
III	0,06	0,03	0,06	0,07	0,03	0,06	0,04	0,01
FRAXA								
IV	0,01	0,02	0,00	0,00	0,01	0,12	0,02	0,06
V	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,12

К – контроль без обработки; FdU – обработка 5-фтордезоксисуридином

Во всех клеточных линиях (как пациентов, так и здоровых контролей) без обработки 5-фтордезоксисуридином самым распространенным является паттерн локализации I. Он встречается с частотой от 0,83 до 0,89. Доля других паттернов локализации, которые относятся к норме – II и III, намного меньше и составляет от 0,03 до 0,09. Паттерн IV в клетках, не обработанных 5-фтордезоксисуридином, возникает спорадически, независимо от того, какая это клеточная линия, контрольная или полученная от пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы. Его частота встречаемости не превышает 0,02. Паттерн V в клеточных линиях без воздействия 5-фтордезоксисуридина не встречается вообще, независимо от клеточной линии. Как при попарном сравнении, так и при объединении показателей нами не выявлено достоверных отличий по распределению паттернов локализации сигналов между клеточными линиями, полученными от пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы и контрольными клетками без обработки 5-фтордезоксисуридином. Сравнение проводили с использованием критерия χ^2 с поправкой Йейтса и точного критерия Фишера. Однако после обработки 5-фтордезоксисуридином картина распределения паттернов локализации значительно меняется. Что касается контрольных клеточных линий, то в них не наблюдается достоверных отличий распределений при воздействии реагента и без такового (при анализе с помощью критерия χ^2 с поправкой Йейтса и точного критерия Фишера). Основные изменения в распределении касаются клеточных линий пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы. Это свидетельствует об отсутствии влияния 5-фтордезоксисуридина на сайт FRAXA в нормальных клеточных линиях. Однако в линиях клеток пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы после воздействия 5-фтордезоксисуридина происходило достоверное увеличение паттернов локализации IV и V ($P < 0,001$, точный критерий Фишера) (см. табл. 1), характерных для экспрессии ломкого сайта FRAXA. Высокая статистическая достоверность изменений, происходящих в линиях клеток пациентов, свидетельствует о высокой информативности метода гибридизации с использованием двух зондов после

обработки клеток 5-фтордезоксиуридином для выявления носителей синдрома ломкой X-хромосомы.

Пример исследования клинического случая умственной отсталости с использованием разработанного подхода визуализации ломких сайтов FRAXA. Обследована семья, в которой один сын является носителем умственной отсталости на фоне синдрома ломкой X-хромосомы (CPG11), а второй – умственной отсталости неопределенной природы (CPG9). Их мать анеуплоидна по количеству X-хромосом и имеет маркерные хромосомы (CPG10), которые произошли из X-хромосомы. Размер повтора в гене *FMRI* определяли с помощью ПЦР с последующим электрофорезом в агарозном геле. Образец ДНК CPG11 не давал ПЦР-продукта, образец ДНК CPG9 дал продукт размером около 30 п.н., и образец ДНК CPG10 дал два продукта размером 20 и 169 п.н. Анализ метилирования показал, что промотор гена *FMRI* метилирован у CPG11 и неметилирован у CPG9. Таким образом, можно сделать вывод, что CPG11 – носитель метилированной полной мутации, из-за чего не синтезируется протяженный GC-богатый продукт.

Для подтверждения выводов разработанный подход был применен в цитогенетическом анализе с использованием двух проб: *FMRI* и *GPR50* (рис. 5).

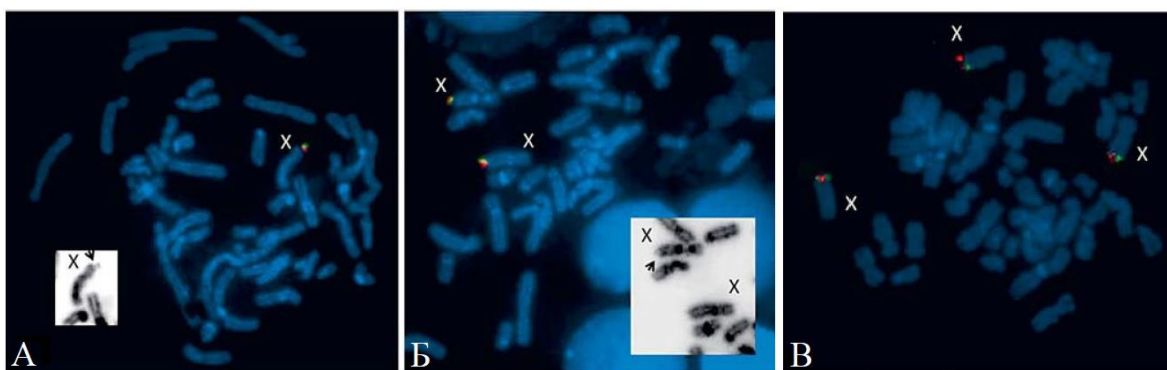


Рисунок 5. Локализация проб *FMRI* (красный) и *GPR50* (зеленый) на метафазных хромосомах пациента CPG11 (А) и CPG10 (Б, В).

На врезках – инвертированная окраска DAPI; стрелкой указан ломкий сайт FRAXA.

Анализ 51 метафазной пластинки пациента CPG9 показал отсутствие ломких сайтов FRAXA, что подтверждает результаты ПЦР и оценки метилирования. В случае пациента CPG11 анализ 100 метафазных пластинок показал наличие ломкого сайта на 14% X-хромосом (см. рис. 5А), что соответствует синдрому ломкой X-хромосомы. Анализ 124 метафазных пластинок CPG10 позволил установить наличие ломкого сайта в 5% X-хромосом (см. рис. 5Б, В) и анеуплоидию по X-хромосоме (см. рис. 5В). Полученные результаты также указывают на то, что крупная премутация размером около 160 триплетов приводит к ломкости хромосом, но с частотой ниже таковой при синдроме ломкой X-хромосомы.

Таким образом, разработан подход для визуализации ломкого сайта FRAXA посредством локализации двух зондов с помощью FISH. Зонды содержат ген *FMRI* в котором находится ломкий сайт FRAXA и ген *GPR50*, расположенный более

теломерно. Подход протестирован на модельных клеточных линиях В-лимфоцитов, полученных от пациентов, а также использован при исследовании клинических случаев фраксопатий. Такой метод анализа позволяет выявить не только полную мутацию, но и крупную премутацию, так как при ней также появляется ломкость хромосом.

Глава 5. Механизм образования ломкого сайта FRAXA при синдроме ломкой X-хромосомы

Влияние камптотецина на частоту образования ломких сайтов FRAXA. Камптотецин снижает ломкость хромосом, индуцированную афидиколином, в районах обычных ломких сайтов за счет снижения вероятности образования вторичных структур, препятствующих продвижению репликативной вилки (Arlt, Glover, 2010). В связи с этим было решено исследовать влияние камптотецина на образование ломких сайтов FRAXA, индуцируемых 5-фтордезоксисуридином. Исследование проводили на иммортализованных линиях В-лимфоцитов пациентов и здоровых контролей с использованием описанного ранее молекулярно-цитогенетического подхода для выявления ломких сайтов FRAXA. 5-фтордезоксисуридин в концентрации 0,1 мкМ в отсутствие камптотецина в контрольных линиях GM06895 и GM06865 вызывает образование ломкого сайта FRAXA с частотой не более 1%. Линия клеток GM06897, которая несет метилированную полную мутацию по гену *FMR1*, экспрессирует ломкий сайт FRAXA на уровне 6% в тех же условиях. Однако это отличие от контрольных клеточных линий не достоверно. Иная картина наблюдается в двух клеточных линиях, несущих метилированную полную мутацию: GM03200 и GM04025. Эти клетки экспрессируют ломкий сайт FRAXA на уровне 16-20% (рис. 6). Добавление 3 нМ камптотецина к линиям клеток с повышенной экспрессией FRAXA снижало его частоту на 65% в линии GM03200 и на 46% в линии GM04025 ($P=0,03$, точный тест Фишера). Добавление 30 нМ камптотецина приводило к дальнейшему снижению экспрессии ломкого сайта FRAXA ($P<0,05$) (см. рис. 6). Снижение частоты образования ломкого сайта FRAXA при добавлении камптотецина отмечено также в линии GM06897 с неметилированной полной мутацией, однако это снижение статистически не достоверно.

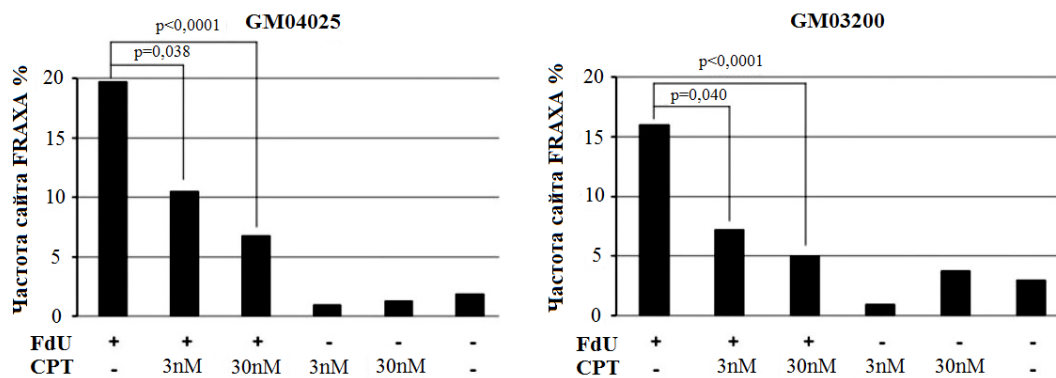


Рисунок 6. Влияние камптотецина (CPT) на экспрессию ломкого сайта FRAXA, индуцируемого 5-фтордезоксисуридином (FdU) в линиях immortalized В-лимфоцитов.

Клетки инкубировали с 5-фтордезоксисуридином в присутствии камптотецина или без него в течение 18 часов.

Для определения влияния камптотецина на митоз был проведен анализ митотического индекса в линии GM04025, который показал, что 5-фтордезоксисуридин в концентрации 0,1 мкМ не снижает количество клеточных делений ($p=0,29$). Однако камптотетин с повышением концентрации снижал митотический индекс. Исходя из полученных данных можно утверждать, что камптотетин является не только ингибитором топоизомеразы I, но и индуктором чекпойнтов клеточного цикла. В связи с этим было решено исследовать влияние на экспрессию ломкого сайта FRAXA другого индуктора чекпойнтов, который бы не ингибировал репликативный аппарат клетки. Митомицин С включает чекпойнты клеточного цикла, внося повреждения в ДНК и при этом не влияя на активность топоизомеразы I. Установлено, что он снижает митотический индекс и ломкость хромосом, индуцированную 5-фтордезоксисуридином (рис. 7). Таким образом, и камптотетин в любой концентрации, и митомицин С подавляют экспрессию ломкого сайта FRAXA путем внесения повреждений в ДНК и тем самым затормаживая клеточный цикл, что дает клетке время закончить репликацию в районе ломких сайтов FRAXA, которые относятся к труднореплицируемым районам.

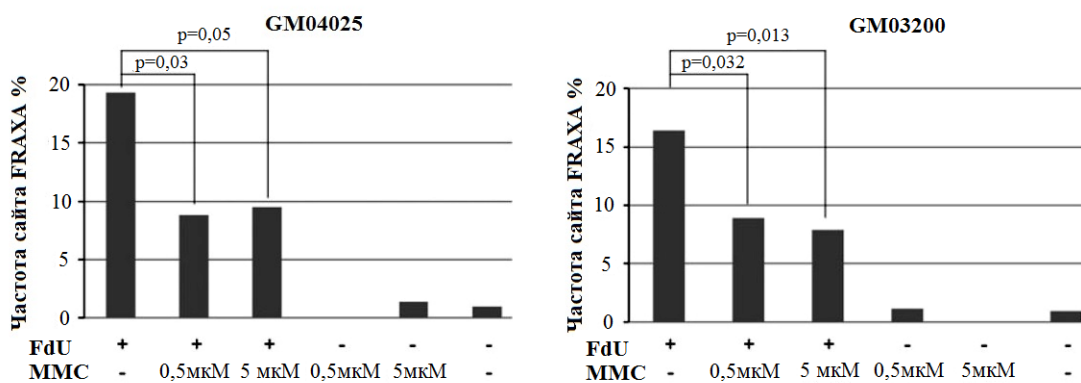


Рисунок 7. Влияние митомицина С (ММС) на экспрессию ломкого сайта FRAXA, индуцируемого 5-фтордезоксисуридином (FdU) в линиях иммортализованных В-лимфоцитов.

Клетки инкубировали с 5-фтордезоксисуридином в присутствии митомицина С или без него в течение 18 часов.

Активность ориджинов репликации, локализованных в районе CGG-повтора, в различных типах клеток. Способность веществ, повреждающих ДНК, снижать экспрессию ломких сайтов свидетельствует о том, что длинный тракт CGG-повторов блокирует продвижение репликативной вилки. Повреждения в ДНК активируют чекпойнты, не давая клетке войти в митоз и тем самым давая время закончить репликацию повторенному участку. Для понимания основ блокирования репликативной вилки проведено исследование 5' конца гена *FMR1*. Ранее в двух независимых исследованиях было установлено наличие ориджинов репликации в этом районе (Brylawski et al., 2007; Gray et al., 2007). Анализ геномных данных по активности ориджинов репликации путем глубокого секвенирования выделенных растущих цепей ДНК подтвердил наличие инициации репликации в районе гена *FMR1* в различных типах клеток. Участок, содержащий ориджины, представлен на рисунке 8. На изображении ориджин I локализован ближе к центромере. Ориджины I и II локализованы более центромерно относительно точки начала транскрипции. Ориджин III локализован ниже CGG-повтора в районе интрона 1.

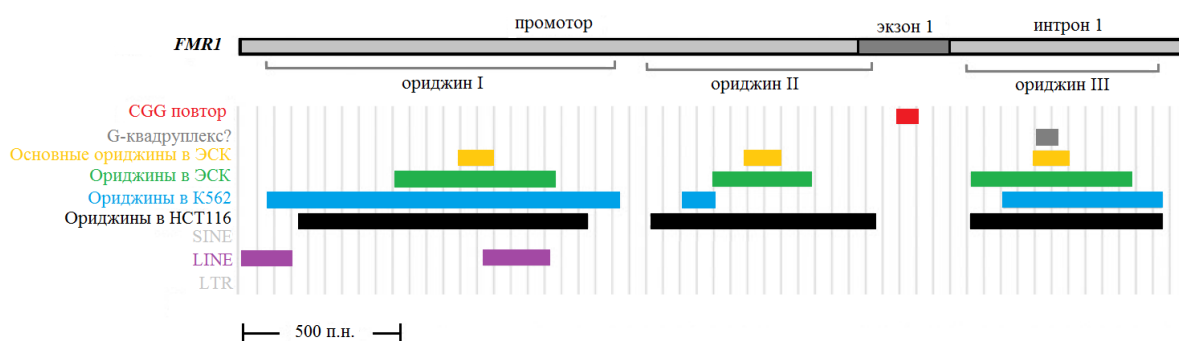


Рисунок 8. Схема участка длиной 3 т.п.н. в 5' районе гена *FMR1*, в котором выявлены три точки инициации репликации. Указаны различные структурные элементы, выявленные по последовательностям в данном районе.

Активация репликации в районе гена *FMRI* в линиях иммортализованных В-лимфоцитов. Оценка количества вновь синтезированных фрагментов ДНК в районе промотора гена *FMRI* проведена в В-лимфоцитах пациентов и в контрольных клеточных линиях в присутствии и отсутствии 5-фтордезоксидуридина. Оценка проводилась с использованием праймеров, опубликованных ранее (Gray et al., 2007). Были выделены фрагменты ДНК размером 0,5-1 т.п.н. Протяженность исследуемого района составила 17 т.п.н.

В отсутствие 5-фтордезоксидуридина контрольная клеточная линия GM06895, несущая нормальный аллель гена *FMRI*, показала широкий почти симметричный пик активации репликации, охватывающий CGG-повтор на 5' конце гена *FMRI* (рис. 9). Таким образом, в норме в гене *FMRI* в В-лимфоцитах присутствует зона активации репликации, расположенная ближе к теломере относительно ориджинов репликации, описанных ранее для фибробластов по такой же методике (Brylawski et al., 2007; Gray et al., 2007). Высота пика, наблюдаемого в В-лимфоцитах, примерно в 20 раз выше таковой для хорошо охарактеризованного ориджина гена *LMNB2*. Этот пик расположен немного выше CGG-повтора и совпадает с ориджином II, выявленным методом глубокого секвенирования в других клеточных линиях. Во второй контрольной клеточной линии GM06865 в исследуемом районе также наблюдался пик активации репликации, однако общая высота пика была ниже, чем в линии GM06895 относительно таковой в гене *LMNB2*. Кроме того, в дополнение к основному пику, расположенному немного ниже CGG-повтора, на 5' конце наблюдается небольшой дополнительный пик активации репликации (см. рис. 9).

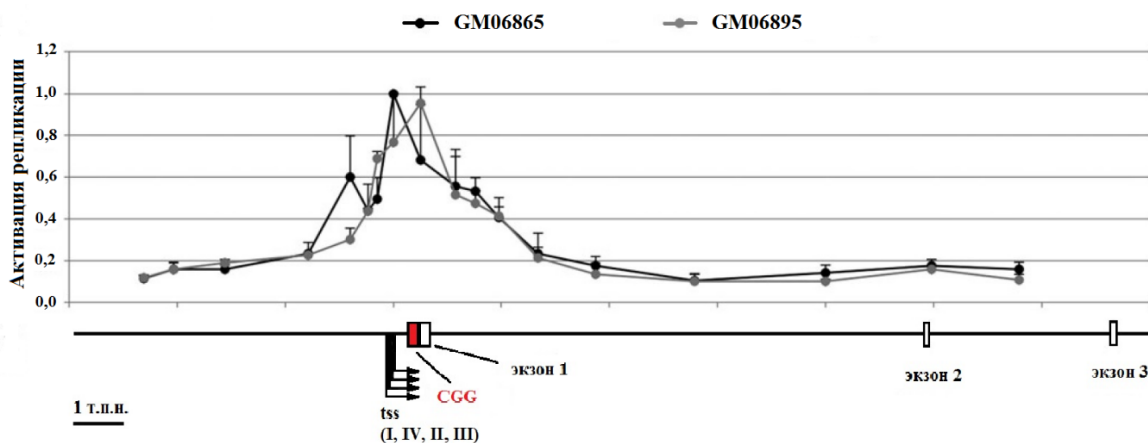


Рисунок 9. Профиль активации репликации в районе гена *FMRI* в контрольных клеточных линиях (tss – сайты начала транскрипции).

Вертикальные отрезки – доверительные интервалы.

Премутантная клеточная линия GM06891, несущая 112 CGG-повторов, а также особая клеточная линия GM06897, несущая неметилованную полную мутацию размером 477 триплетов, показали профили активации репликации, состоящие из нескольких пиков в одном и том же районе (рис. 10). Кроме того, исследования варианта линии GM06891, в котором произошла экспансия повторов во время культивирования до 183 триплетов, выявили, что ее профиль активации репликации

не отличается от исходной клеточной линии. Профиль активации репликации, показанный для контрольной клеточной линии GM06865, примерно совпадал с данными по локализации ориджинов I, II и III, полученными при анализе генома. То, что не наблюдается трех отдельных пиков в других клеточных линиях, может быть обусловлено либо разрешающей способностью метода, либо особенностями использования различных ориджинов в этих клеточных линиях. Однако во всех исследованных культурах район, соответствующий ориджину II, показал наивысший уровень активации репликации в отличие от ориджинов I и III, что говорит о преимущественном использовании именно ориджина II в В-лимфоцитах.

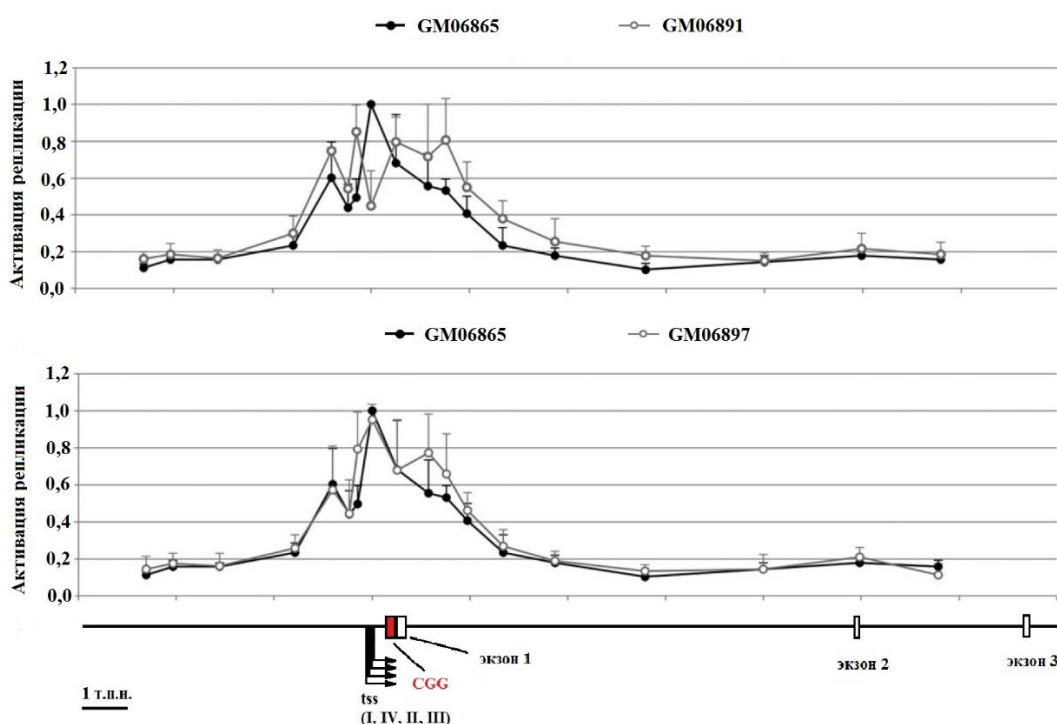


Рисунок 10. Сравнение профилей активации репликации в премутантной клеточной линии – GM06891, клеточной линии с неметирированной полной мутацией GM06897 и контрольной клеточной линии GM06865.

Разница в длине CGG-повтора во всех клеточных линиях не отмечена на схеме. tss – сайты начала транскрипции. Вертикальные отрезки – доверительные интервалы.

Иной характер имеет активация репликации в линиях клеток, несущих полную мутацию: GM03200 и GM04025. В районе ориджина II присутствует провал профилей активации репликации. При этом количество ПЦР-продукта непосредственно в районе CGG-повтора с 5' конца было в 13-80 раз ниже, чем в случае контрольной линии клеток, а с 3' конца – в 5-15 раз ниже, чем в контроле. При этом можно увидеть два пика: в районе ориджинов I и III (рис. 11). Таким образом, активация репликации в районе ориджина II, который является основным в контрольных клеточных линиях, подавлена у пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы.

Для исследования влияния 5-фтордезоксифуридина на профили активации репликации был проведен аналогичный эксперимент, но с инкубацией клеток в присутствии 0,1 мкМ реагента в течение 2 и 18 часов. Профили репликации не изменялись по сравнению с необработанными клетками, независимо от времени воздействия реагента (рис. 12). Таким образом, 5-фтордезоксифуридин не создает каких-либо дополнительных трудностей репликации в клеточных линиях пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы.

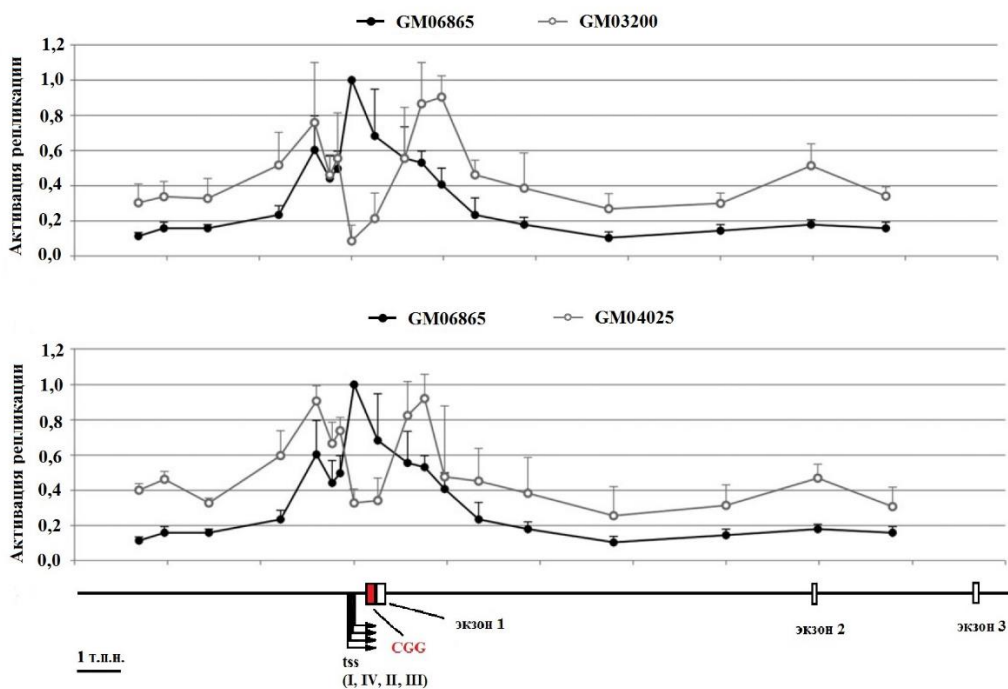


Рисунок 11. Сравнение профилей активации репликации в клеточных линиях с полной мутацией – GM03200 и GM04025 с контрольной клеточной линией GM06865.

Разница в длине CGG-повтора во всех клеточных линиях не отмечена на схеме. tss – сайты начала транскрипции. Вертикальные отрезки – доверительные интервалы.

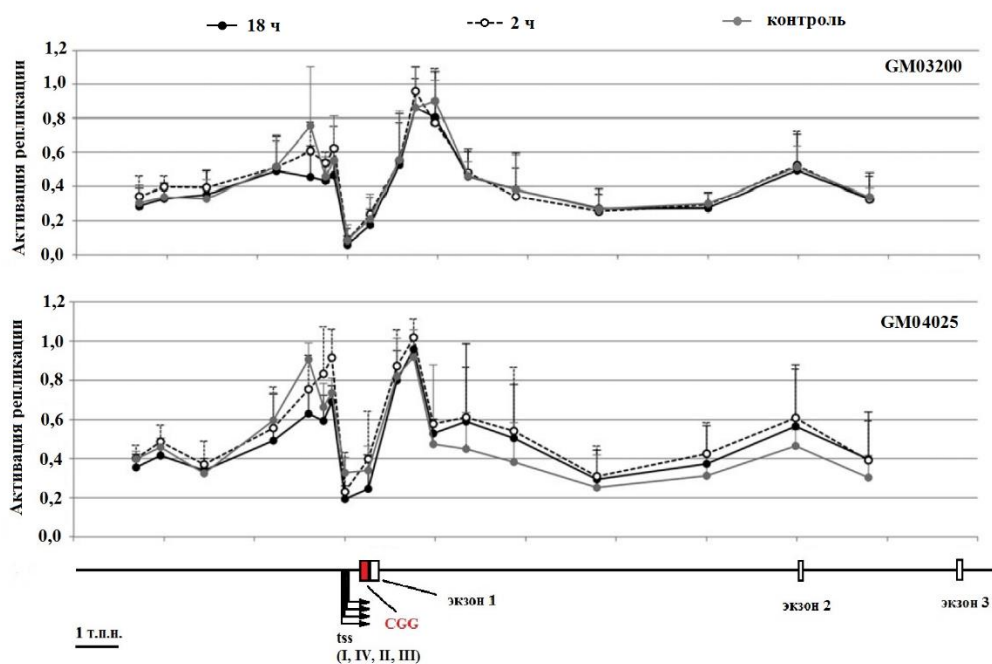


Рисунок 12. Влияние времени инкубации клеток в присутствии 5-фтордезоксипуридина на профили активации репликации в культурах клеток пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы (GM03200 и GM04025) (обозначения как на рис. 11).

Особенности репликации фолатчувствительных ломких сайтов хромосом.

В норме ген *FMRI* реплицируется поздно, а аллели, несущие полную мутацию, реплицируются еще позже. Для понимания того, является ли поздняя репликация общим свойством фолатчувствительных ломких сайтов, проведено исследование времени репликации 23 других фолатчувствительных ломких сайтов, которые экспрессируются в лимфобластоидных клетках (Lukusa, Fryns, 2008). По базам данных проанализировано время репликации фолатчувствительных ломких сайтов с точно известной хромосомной локализацией (*FRAXA* (Verkerk et al., 1991), *FRAXE* (Gecz et al., 1996; Gu et al., 1996), *FRAXF* (Parrish et al., 1994; Ritchie et al., 1994), *FRA10A* (Sarafidou et al., 2004), *FRA11A* (Debacker et al., 2007), *FRA11B* (Jones et al., 1995), *FRA12A* (Winnepenninckx et al., 2007)), в линиях клеток: BG02 (эмбриональные стволовые клетки), C0202-1 (лимфобластоидные клетки) и IMR90 (фибробласты). В результате нами установлено, что лишь некоторые из указанных ломких сайтов реплицируются поздно в данных клеточных линиях, в то время как большинство – в ранней S-фазе. Для остальных 17-ти фолатчувствительных ломких сайтов, районы локализации которых не являются точно картированными, показано, что некоторые из них расположены в ранореплицирующихся районах, другие – в позднеореплицирующихся районах, третьи – в смешанных районах.

Таким образом, фолатчувствительные ломкие сайты хромосом реплицируются на разных этапах S-фазы клеточного цикла. Поздняя репликация локуса, содержащего CGG-повтор, не является фактором, определяющим ломкость

хромосом. Следует отметить, что общим свойством всех точно картированных фолатчувствительных ломких сайтов является их расположение в 5' областях генов и наличие одного или нескольких кластеризованных ориджинов.

Анализ причин ломкости сайта FRAXA. Установлено, что клеточные линии В-лимфоцитов, полученные как от пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы, так и от здоровых контролей, содержат область активации репликации в промоторной области гена *FMRI*, которая захватывает CGG-повтор. Было выявлено три пика активации репликации, что соответствует данным, полученным ранее методом глубокого секвенирования. Эта зона ориджинов является GC-богатой (60,1%), а ее 3' конец, в частности ориджин III, соответствует критерию CpG-островков с содержанием GC 69% и наблюдаемым/ожидаемым CpG-соотношением 80%. Тут расположены сайты начала транскрипции, что характерно для других зон инициации репликации (Sequeira-Mendes et al., 2009; Martin et al., 2011). В-лимфоциты пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы, в которых нет транскрипции гена *FMRI* и присутствует экспрессия ломкого сайта, показали изменение профиля активации репликации по сравнению с нормальной клеточной линией и метилированной полной мутацией, которая сохраняет экспрессию гена. Согласно полученным данным, количество вновь синтезированных цепей из центральной зоны активации, соответствующей ориджину II, катастрофически снижается в клеточных линиях пациентов. Это указывает на то, что метилированный повтор влияет на активацию репликации и рост цепей. Однако он не затрагивает активность ориджинов I и III.

Обработка клеток пациентов 5-фтордезоксинуридином индуцирует образование ломких сайтов FRAXA, при этом не меняя профиля активации репликации. Это свидетельствует о том, что 5-фтордезоксинуридин не усугубляет проблем репликации, которые уже существуют в районе ломкого сайта. Действие реагента, скорее всего, не прямое, а опосредовано нарушением баланса нуклеотидов, что влияет на репликацию в целом в клетке. Более медленная репликация по причине нарушения баланса нуклеотидов приводит к увеличению числа клеток, которые вошли в митоз до завершения репликации локуса FRAXA. Если это так, то обработка камптотецином снижает ломкость хромосом не из-за того, что снижает количество нарушений ДНК, блокирующих репликативную вилку, как предполагалось для обычных ломких сайтов (Arlt, Glover, 2010). Ломкость хромосом снижается посредством эффективного включения клеточных чекпойнтов, которые не дают клетке перейти к митозу и тем самым дают время на завершение репликации CGG-повтора. Это подтверждается тем фактом, что митомицин С, который не взаимодействует с топоизомеразой I, имеет аналогичный эффект снижения ломкости сайта FRAXA. Также это соответствует ранее полученным данным о том, что UCN-01, ингибитор CHK1, важной чекпойнткиназы S-фазы клеточного цикла, повышает ломкость хромосом в локусе FRAXA. Причина повышения ломкости заключается в отсутствии контроля в чекпойнте, клетки быстрее входят в митоз (Kumari et al., 2009). Исходя из этого, можно предложить модель образования

ломкого сайта FRAXA, которая основана на том, что в районе экспансии CGG-повтора подавлена инициация репликации, а общее замедление процесса удвоения ДНК в клетке в результате добавления 5-фтордезоксидуридина приводит к недорепликации и образованию разрывов на хромосомах (рис. 13).

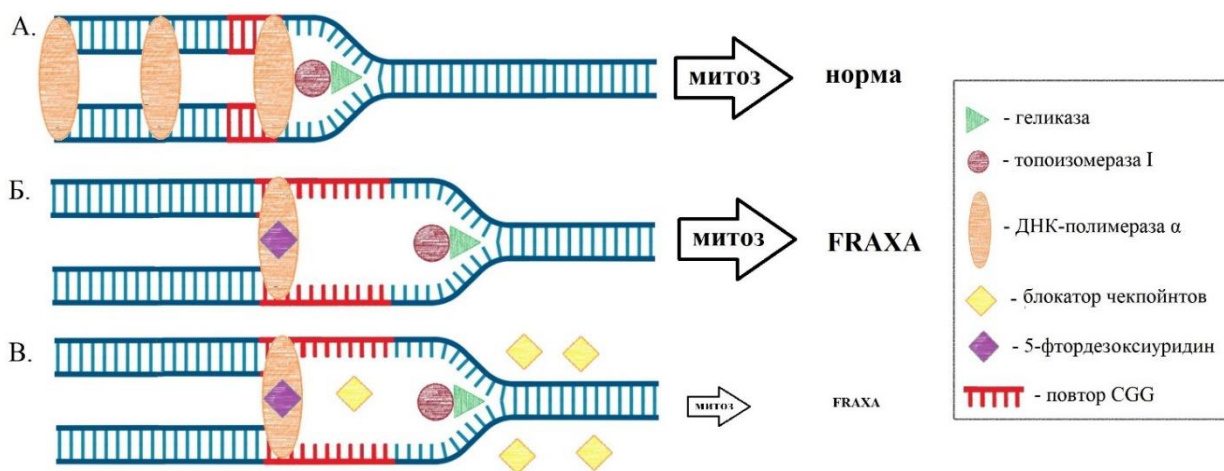


Рисунок 13. Модель образования ломкого сайта FRAXA.

А – при нормальном размере повтора движение комплекса геликазы/топоизомеразы I соответствует активности инициации репликации и ДНК-полимеразы I, идет нормальное удвоение ДНК. Б – при увеличенном повторе и добавлении 5-фтордезоксидуридина идет общее подавление репликации и инициации репликации, притом что инициаторная активность и так снижена в районе ломкого сайта. При этом продолжается работа комплекса геликазы/топоизомеразы I и происходит недорепликация расплавленных участков. Как результат, участок не успевает реплицироваться во время митоза и образуется ломкий сайт FRAXA. В – при ситуации, аналогичной Б, но в присутствии любого ингибитора прохождения чекпойнтов снижается количество клеток, перешедших к делению, тем самым появляется запас времени на репликацию участка повтора и количество ломких сайтов FRAXA снижается.

Факт того, что даже в отсутствие 5-фтордезоксидуридина есть затруднение репликации в районе FRAXA, позволяет предположить, что ломкость хромосом – это не просто артефакт, присутствующий *in vitro*. Женщины, носительницы метилированной полной мутации по гену *FMRI*, очень часто являются носительницами мозаичного синдрома Шерешевского-Тернера, при котором теряется X-хромосома, несущая мутантный аллель (Dobkin et al., 2009). Это может являться последствием ломкости хромосом и появления разрыва в районе FRAXA. Слияние двух сестринских хроматид после разрыва приводит к образованию дицентрической хромосомы, которая теряется при клеточном делении. Однако нет данных о потере хромосом, несущих другие ломкие сайты, что, вероятно, связано с тем, что потеря аутосом, в отличие от X-хромосомы, является летальной для клетки.

Глава 6. Влияние ингибиторов деацетилаз гистонов на экспрессию гена *FMRI*

Необходимость разработки подходов для реактивации гена *FMRI*. Исследование молекулярных механизмов развития любого заболевания имеет конечной целью разработку средств для его излечения. Разработки методов терапии

синдрома ломкой X-хромосомы ведутся практически с момента его открытия и описания причин его развития. Один из таких методов – это симптоматическая терапия, однако она не влияет на молекулярный механизм развития заболевания и не восстанавливает экспрессию гена *FMRI*. Поиск лекарственных средств, которые бы восстанавливали экспрессию данного гена, безусловно, является очень актуальной проблемой в исследовании фраксопатий.

Развитие терапевтических подходов для лечения синдрома ломкой X-хромосомы, которые бы затрагивали молекулярный механизм развития заболевания, включает в себя поиск веществ, способных ингибировать ферменты, отвечающие за гетерохроматинизацию. Этот процесс включает в себя два наиболее значимых события: метилирование ДНК и модификацию гистонов, в первую очередь деацетилирование (Юдкин и др., 2015). Один из таких подходов включает использование 5-азадезоксцитидина – ингибитора ДНК-метилтрансфераз. Известно, что это вещество активирует экспрессию гена *FMRI* в клеточных линиях, полученных от пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы (Chiurazzi et al., 1998; Tabolacci et al., 2016b). Недостатком использования этого вещества является его крайне высокая цитотоксичность, что выводит его из ряда потенциальных терапевтических агентов. Дополнительно проводятся исследования других ферментов модификации хроматина – деацетилаз гистонов. Слабое, но очевидное реактивирующее влияние на ген *FMRI* было показано для трех ингибиторов деацетилаз гистонов: 4-фенилбутирата, бутирата натрия и трихостатина А. Однако из-за крайне низкого реактивирующего эффекта эти ингибиторы также не могут быть использованы в клинической практике (Chiurazzi et al., 1999).

На сегодня три ингибитора деацетилаз гистонов одобрены FDA (Food and Drug Administration, США) как лекарства для лечения рака: вориностат, белиностат и ромидепсин. Вориностат и белиностат относятся к гидроксамовым кислотам. Таким образом, они аналогичны по своей структуре и принципу действия трихостатину А и ингибируют деацетилазы гистонов I и II классов. Ромидепсин – это дипептид, ингибирующий деацетилазы гистонов I класса. Именно ингибиторы гистоновых деацетилаз рассматриваются как наиболее перспективные реактиваторы подавленной экспрессии гена *FMRI* для возможного внедрения в клиническую практику (Tabolacci, Chiurazzi, 2013).

Влияние 5-азадезоксцитидина на экспрессию гена *FMRI*. Для того, чтобы показать возможность реактивации гена *FMRI* в исследуемых клеточных линиях пациентов, была проведена обработка клеток известным реактиватором – 5-азадезоксцитидином, который ингибирует ДНК-метилтрансферазы и тем самым снижает гетерохроматинизацию. Реактивация гена *FMRI* была обнаружена во всех исследуемых клеточных линиях (табл. 2). Следует отметить, что в линии клеток пациента GM04025 реактивация происходит до уровня экспрессии в контрольных клеточных линиях без обработки. В линии клеток пациента CPG7 также наблюдали достоверную реактивацию, однако на более низком уровне.

Таблица 2. Экспрессия гена *FMRI* в различных линиях клеток в зависимости от обработки реагентами.

Линия клеток	5-азадезоксцитидин		Ингибиторы деацетилаз гистонов			
	Контроль	Эксперимент	Контроль	ДМСО	Трихостатин А	Вориностат
GM06895	1,02±0,3	12,09±3,27	1,00±0,11	1,11±0,05	1,36±0,15	1,41±0,08
GM06865	5,57±1,19	10,48±0,22	9,50±2,85	7,36±1,10	9,85±1,86	6,05±2,59
GM04025	0	4,97±0,20	0	0	0,06±0,01	0,14±0,07
CPG7	0	0,30±0,05	0	0	0	0

Во всех культурах клеток произошло значительное снижение жизнеспособности. Так, в линии CPG7 она снизилась до 85%, в то время как в линии GM04025 жизнеспособность после обработки составила 68% от исходной. Эти данные еще раз подтверждают цитотоксичность 5-азадезоксцитидина.

Влияние ромидепсина и вориностата на экспрессию гена *FMRI*. Диапазон концентраций ингибиторов и время инкубации подбирали на основе ранее опубликованных данных (Mizutani et al., 2010; Yu et al., 2011). Подбор концентрации осуществляли на клеточной линии GM04025, так как в работах с 5-азадезоксцитидином она показала самую низкую жизнеспособность. Для каждой использованной концентрации оценивали жизнеспособность клеток и измеряли уровень мРНК гена *FMRI*. Ромидепсин не активировал экспрессию этого гена; более того, инкубация с реактивом в высоких концентрациях приводила к полной гибели клеточной культуры. Таким образом, предварительные эксперименты показали, что ромидепсин не может быть использован как терапевтический активатор гена *FMRI* ввиду отсутствия детектируемого уровня мРНК гена и крайне высокой цитотоксичности реактива. В отличие от этого вориностат активировал экспрессию гена *FMRI* при концентрации 5 мкМ, однако высокая цитотоксичность все равно наблюдалась.

В эксперименте клеточные линии инкубировали с вориностатом в течение 72 часов. Для контроля клетки инкубировали с трихостатином А – хорошо известным ингибитором деацетилаз гистонов, который реактивирует экспрессию *FMRI* в клеточных линиях (Chiurazzi et al., 1999). В линиях GM06865 и GM06895 не было выявлено статистически значимых различий в экспрессии гена *FMRI* в присутствии и в отсутствие трихостатина А ($P > 0,05$) (см. табл. 2). Что касается инкубации с вориностатом, только линия GM06895 показала незначительное достоверное увеличение экспрессии гена *FMRI* ($P < 0,05$). В клеточной линии CPG7 детектируемый транскрипт *FMRI* не обнаружен как в ответ на обработку вориностатом, так и трихостатином А (см. табл. 2). Однако вторая клеточная линия пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы GM04025 показала реактивацию гена *FMRI* в ответ на инкубацию как с трихостатином А, так и с вориностатом. Но разница в уровне экспрессии между двумя реактивами не была статистически достоверной ($P > 0,05$). Уровень экспрессии гена *FMRI* в линии GM04025 после

обработки трихостатином А и вориностатом составил 6% и 14% от уровня экспрессии этого гена в контрольной линии GM06895. Все культуры клеток показали статистически достоверное снижение жизнеспособности в ответ на обработку как трихостатином А, так и вориностатом. Вориностат достоверно более цитотоксичный по сравнению с трихостатином А во всех клеточных линиях, за исключением GM04025, где различия не достоверны. Жизнеспособность контрольных клеточных линий выше по сравнению с линиями пациентов, в ответ на обработку ингибиторами деацетилаз гистонов происходило не такое сильное снижение жизнеспособности. Вестерн-блот анализ показал незначительное увеличение количества белка FMRP в контрольных клеточных линиях в ответ на обработку ингибиторами деацетилаз гистонов (рис. 14). В клетках пациентов белок не детектировался, даже если присутствовала мРНК гена *FMR1* в ответ на обработку ингибиторами деацетилаз гистонов.

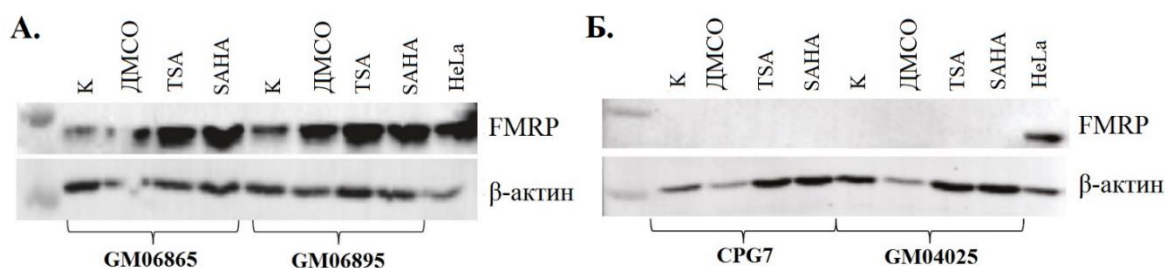


Рисунок 14. Уровень белка FMRP в контрольных клеточных линиях (А) и в линиях клеток пациентов (Б) после обработки ингибиторами деацетилаз гистонов: TSA – трихостатина А и SAHA – вориностата.

Перспективы использования ингибиторов деацетилаз гистонов в качестве потенциальных терапевтических препаратов для борьбы с фраксопатиями. Исследования реактивирующей способности деацетилаз гистонов позволяют приблизиться к решению двух вопросов: разработке подходов для терапии синдрома ломкой X-хромосомы и пониманию механизмов подавления экспрессии гена *FMR1*. Инкубация клеток с ромидепсином в повышающихся концентрациях приводила к полной гибели клеток без активации экспрессии гена *FMR1*. В отличие от этого вориностат в концентрации 5 мкМ активировал экспрессию гена *FMR1* в клеточной линии GM04025, полученной от пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы. Ромидепсин и вориностат являются ингибиторами деацетилаз гистонов I класса. Вориностат дополнительно ингибирует деацетилазы гистонов II класса. Активация гена *FMR1* с помощью вориностата и отсутствие активации с помощью ромидепсина, вероятно, указывает на то, что деацетилазы гистонов II, а не I класса, играют определенную роль в гетерохроматинизации промотора гена *FMR1*. Вориностат активирует экспрессию гена *FMR1* в клеточной линии GM04025 на

низком уровне. Аналогичный низкий уровень активации был показан ранее для другого ингибитора деацетилаз гистонов – трихостатина А (Chiurazzi et al., 1999). В линии GM04025 оба ингибитора активируют экспрессию гена *FMR1* на примерно одинаковом уровне без статистически значимых отличий ($P > 0,05$). Активация гена *FMR1* с помощью ингибиторов ДНК-метилтрансфераз значительно выше, чем с помощью ингибиторов деацетилаз гистонов. Это установлено как в данной работе, так и в ряде предыдущих исследований других авторов (Chiurazzi et al., 1998; Chiurazzi et al., 1999). Следовательно, метилирование ДНК играет ключевую роль в подавлении экспрессии генов, дальнейшее деацетилирование гистонов является последствием метилирования ДНК. Крайне высокая цитотоксичность ингибиторов деацетилаз гистонов при их низком реактивирующем эффекте на ген *FMR1* исключает их дальнейшее рассмотрение в качестве вероятных терапевтических агентов для лечения синдрома ломкой X-хромосомы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено комплексное молекулярно-генетическое исследование фраксопатий на модельных объектах – культуре клеток и лабораторных мышах – и на образцах тканей, полученных от пациентов с этими заболеваниями. Любое исследование наследственных заболеваний включает в себя ряд направлений, задача которых – определить природу и механизмы развития заболевания, провести эпидемиологический анализ, разработать эффективные технологии диагностики, профилактики и лечения. Это же касается и фраксопатий. Известно, что развитие этих заболеваний связано с экспансией повторов CGG в промоторной области гена *FMR1*. Она приводит к гетерохроматинизации и прекращению экспрессии гена. В результате перестает нарабатываться РНК-связывающий белок FMRP, который необходим для правильного развития нейронов. При этом существуют премутантные состояния, при которых нарушается баланс между уровнем мРНК гена *FMR1* и белка FMRP, что приводит к ряду клинических последствий. Экспансия повторов приводит еще к ряду последствий, таких как нарушение путей микроРНК, изменение транскрипции и трансляции всего локуса и образование ломкого сайта FRAXA на X-хромосоме. Образование этого ломкого сайта как следствие может иметь развитие мозаичного синдрома Шерешевского-Тернера у женщин.

В представленной работе было исследовано развитие соматической нестабильности при фраксопатиях. Удалось показать, что соматическая экспансия происходит в различных органах лабораторных мышей, моделей премутации, в разной степени. Она максимальная в клетках головного мозга, печени и несоматических клетках семенников. Это крайне важно для понимания развития заболевания у человека. Размер повтора определяет остроту симптомов. Соматическая экспансия, например в головном мозге, может повышать клинические проявления заболевания, а сокращения повтора могут приводить к снижению остроты симптомов. Следует учитывать, что в случае работы с пациентами проводится анализ размера повтора CGG в образцах периферической венозной крови. Как показали результаты, полученные на модельных мышах, размер повтора

в головном мозге при этом будет больше за счет соматической экспансии. Анализ посмертных образцов головного мозга пациентов с синдромом атаксии/тремора, ассоциированного с ломкой X-хромосомой, подтвердил наличие соматической экспансии в головном мозге человека.

Анализ образцов крови пациентов с фраксопатиями из ГБУЗ Новосибирской области «Городская клиническая больница №1» выявил практически во всех образцах наличие соматического мозаицизма по размеру повтора CGG. Для оценки этого мозаицизма нами был разработан индекс соматической нестабильности, который учитывает медиану длин всех аллелей и разброс значений этих длин. Индекс соматической нестабильности коррелирует с нарушениями функциональной коннективности между отделами головного мозга пациентов с фраксопатиями, что и отражает влияние длины повтора и соматической экспансии на остроту проявления симптомов, в частности на когнитивные способности.

Молекулярно-генетическая диагностика фраксопатий направлена в первую очередь на определение размера повтора, что наиболее информативно. Однако крайне высокое GC-содержание промоторной области гена *FMRI* делает амплификацию этого участка нетривиальной задачей. В данной работе представлен подход для визуализации ломкого сайта FRAXA с помощью FISH, который может быть использован для диагностики. Он заключается в локализации двух зондов, один из которых содержит ген *FMRI* и маркирует локус FRAXA, а второй содержит ген *GPR50* и маркирует дистальный участок хромосомы, который теряется при образовании ломкого сайта. Использование именно такого подхода позволяет значительно повысить информативность результатов гибридизации. Было описано пять паттернов локализации сигналов от двух зондов и достоверное повышение паттернов, характерных для ломкого сайта у пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы при добавлении 5-фтордезоксифторуидина к культивируемым клеткам. Разработанный подход был успешно использован для диагностики более 150 пациентов, обратившихся в ГБУЗ Новосибирской области «Городская клиническая больница №1» с подозрением на синдром ломкой X-хромосомы.

Имея в руках инструмент визуализации ломкого сайта FRAXA, мы исследовали механизм его образования. Было показано, что в промоторной области гена *FMRI* в В-лимфоцитах находится зона активации репликации, которая содержит три ориджина с основным вторым ориджином. В клетках пациентов с полной мутацией катастрофически снижена активность основного ориджина, из-за чего затруднена репликация участка повтора. При фолатном стрессе снижается общий уровень репликации в клетке, в результате чего повтор CGG не успевает реплицироваться до вхождения клетки в митоз, образуется ломкий сайт. Эффект снижения ломкости при добавлении ингибиторов чекпойнтов связан с тем, что в митоз входит меньшее количество клеток с недореплицированным повтором.

В заключительной части работы была исследована возможность использования одобренных FDA ингибиторов деацетилаз гистонов – ромидепсина и вориностата – в качестве терапевтических агентов для борьбы с фраксопатиями для реактивации

экспрессии гена *FMRI*. Удалось показать крайне низкую реактивирующую способность этих веществ, которая значительно ниже таковой у ингибиторов ДНК-метилтрансфераз. Это объясняется превалирующей ролью метилирования ДНК при подавлении экспрессии гена *FMRI*. Таким образом, мы считаем, что дальнейшее исследование деацетилаз гистонов в качестве агентов для терапии фраксопатий не имеет смысла. А развитие современных генотерапевтических подходов открывает новые возможности в поиске методов лечения этих заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. Соматическая экспансия повторов CGG у модельных мышей с премутацией по гену *Fmr1* зависит от возраста и происходит преимущественно в головном мозге, печени и несоматических клетках семенников. В различных отделах головного мозга уровень экспансии разный, наиболее высокий в миндалевидном теле. Уровень экспансии не коррелирует с пролиферативной активностью клеток, уровнем транскрипции гена *Fmr1* и уровнем белков Msh2, Msh3 и Msh6.

2. Соматическая экспансия повторов CGG выявлена в культурах клеток В-лимфоцитов человека с премутацией по гену *FMRI* и в головном мозге пациентов с синдромом атаксии/тремора, ассоциированного с ломкой X-хромосомой.

3. Разработана методика расчета индекса соматической нестабильности у пациентов с фраксопатиями на основе медианы и разброса значений длин всех аллелей в образце. Установлена корреляция индекса соматической нестабильности и степени изменений функциональной коннективности отделов головного мозга пациентов с фраксопатиями.

4. Разработан подход для визуализации ломкого сайта FRAXA с помощью флуоресцентной *in situ* гибридизации с использованием двух зондов, несущих последовательности генов *FMRI* и *GPR50*. Выявлены 5 паттернов локализации, 3 из которых соответствуют норме, а два – наличию ломкого сайта. Показано достоверное увеличение количества паттернов, характерных для FRAXA, в клеточных линиях пациентов с синдромом ломкой X-хромосомы при добавлении 5-фтордезоксифторурацила.

5. Показано, что в промоторной области гена *FMRI* в В-лимфоцитах человека расположена зона активации репликации, представленная тремя ориджинами, обозначенными I, II и III. В клеточных линиях с полной мутацией по гену *FMRI* происходит значимое снижение активности доминирующего в норме ориджина II, что приводит к формированию ломкого сайта FRAXA вследствие незавершенной репликации.

6. 5-фтордезоксифторурацил снижает эффективность репликации в клетке в целом, из-за чего GC-богатый сайт FRAXA не успевает завершить репликацию при вхождении клетки в митоз. Камптотецин и митомицин С выступают в роли блокаторов чекпойнтов и снижают количество делящихся клеток, что приводит к увеличению времени на репликацию FRAXA и снижению ломкости.

7. Исследование ингибиторов деацетилаз гистонов как реактиваторов экспрессии гена *FMRI* показало, что:

- ромидепсин не реактивирует экспрессию гена *FMRI*, а повышение концентрации реагента приводит к гибели клеток;

- вориностат реактивирует экспрессию гена *FMRI* на низком уровне.

Ингибиторы деацетилаз гистонов не могут рассматриваться как перспективные терапевтические агенты для борьбы с фраксопатиями.

8. Ингибиторы ДНК-метилтрансфераз имеют значительно больший реактивирующий эффект на ген *FMRI* в отличие от ингибиторов деацетилаз гистонов, что, вероятно, указывает на преобладающее значение метилирования ДНК в подавлении экспрессии этого гена.

СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Gridina M.M., Shitik E.M., Lemskaya N.A., Minina J.M., Grishchenko I.V., Doloskiy A.A., Shorina A.R., Maksimova Y.V., **Yudkin D.V.** Derivation of iPS cell line (ICGi032-A) from a patient affected with fragile X syndrome. // Stem cell research. 2021. V. 57. P. 102615.

2. Grishchenko I.V., Tulupov A.A., Rymareva Y.M., Petrovskiy E.D., Savelov A.A., Korostyshevskaya A.M., Maksimova Y.V., Shorina A.R., Shitik E.M., **Yudkin D.V.** A transgenic cell line with inducible transcription for studying (CGG)_n repeat expansion mechanisms. // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021. Т. 25. №1. С. 117-124.

3. Doloskiy A.A., Yarushkin A.A., Grishchenko I.V., Lemskaya N.A., Pindyurin A.V., Boldyreva L.V., Pustyl'nyak V.O., **Yudkin D.V.** miRNA expression and interaction with the 3'UTR of *FMRI* in FRAXopathy pathogenesis. // Non-coding RNA research. 2020. V. 6. N. 1. P. 1–7.

4. Grishchenko I.V., Purvinsh Y.V., Imatdinov I.R., Kulemzin S.V., **Yudkin D.V.** Cell system with inducible transcription for the study of CGG repeat instability. // European journal of human genetics. 2020. V. 28. N. 1. P. 359.

5. Doloskiy A.A., Krainikova L.V., Pindyurin A.V., Boldyreva L.V., **Yudkin D.V.** Human *FMRI* gene expression regulation by microRNA in a cellular model. // European journal of human genetics. 2020. V. 28. N. 1. P. 337.

6. Gridina M.M., Orlova P.A., Minina J.M., Shitik E.M., Lemskaya N.A., Grishchenko I.V., Doloskiy A.A., Shorina A.R., Maksimova Y.V., **Yudkin D.V.**, Serov O.L. Establishment of an induced pluripotent stem cell line (ICGi026-A) from peripheral blood mononuclear cells of a patient with fragile X syndrome. // Stem cell research. 2020. V. 49. P. 102070.

7. Shitik E.M., Velmiskina A.A., Doloskiy A.A., **Yudkin D.V.** Reactivation of *FMRI* gene expression is a promising strategy for fragile X syndrome therapy. // Gene therapy. 2020. V. 27. N. 6. P. 247–253.

8. Grishchenko I.V., Purvinsh Y.V., **Yudkin, D.V.** Mystery of expansion: DNA metabolism and unstable repeats. // Advances in experimental medicine and biology. 2020. V. 1241. P. 101–124.

9. Dolskiy A.A., Lemskaya N.A., **Yudkin D.V.** New insights on the role of noncoding RNAs in the pathology of Fragile X-associated disorders. // European journal of human genetics. 2019. V. 27. P. 1732.
10. **Yudkin D.V.**, Grishchenko I.V., Tulupov A.A., Rymareva Y.M., Maksimova Y.V., Shorina A.R. Somatic instability of CGG repeats in the *FMR1* gene is a factor in symptom severity in Fragile X syndrome patients. // European journal of human genetics. 2019. V. 27. P. 1387-1388.
11. **Yudkin D.**, Lemskaya N., Bobokova T., Galanina E., Kolesnikova I. Chromosome fragile site FRAXA visualization in fragile X syndrome patients. // European journal of human genetics. 2018. V. 26. P. 929.
12. Dolskiy A.A., Pustyl'nyak V.O., Yarushkin A.A., Lemskaya N.A., **Yudkin D.V.** Inhibitors of histone deacetylases are weak activators of the *FMR1* gene in fragile X syndrome cell lines. // BioMed research international. 2017. V. 2017. P. 3582601.
13. Isanova E., Petrovskiy E., Savelov A., **Yudkin D.**, Tulupov A. Resting-state fMRI study of patients with fragile X syndrome. // J. Phys.: Conf. Ser. 2017. V. 886. P. 012007.
14. Бобокова Т.С., Лемская Н.А., Колесникова И.С., **Юдкин Д.В.** Метод молекулярно-цитогенетической визуализации ломкого сайта FRAXA. // Молекулярная биология. 2017. Т. 51. №4. С. 704-709.
15. Исанова Е.Р., Петровский Е.Д., Савелов А.А., **Юдкин Д.В.**, Лемская Н.А., Дольский А.А., Тулупов А.А. Исследование нейрональной активности головного мозга у пациентов с синдромом ломкой х-хромосомы методом функциональной МРТ. // Российский электронный журнал лучевой диагностики. 2017. Т. 7. №3. С. 23-30.
16. Galanina E.M., Tulupov A.A., Lemskaya N.A., Korostyshevskaya A.M., Maksimova Y.V., Shorina A.R., Savelov A.A., Sergeeva I.G., Isanova E.R., Grishchenko I.V., **Yudkin D.V.** A female patient with *FMR1* premutation and mosaic X chromosome aneuploidy and two sons with intellectual disability. // Molecular syndromology. 2017. V. 8. N. 2. P. 110–114.
17. **Юдкин Д.В.**, Лемская Н.А., Грищенко И.В., Дольский А.А. Изменение состава хроматина при экспансии тринуклеотидного повтора CGG в гене *fmr1*. // Молекулярная биология. 2015. Т. 49. №2. С. 205-211.
18. **Yudkin D.**, Hayward B.E., Aladjem M.I., Kumari D., Usdin K. Chromosome fragility and the abnormal replication of the *FMR1* locus in fragile X syndrome. // Human molecular genetics. 2014. V. 23. N. 11. P. 2940–2952.
19. Lokanga R.A., Entezam A., Kumari D., **Yudkin D.**, Qin M., Smith C.B., Usdin K. Somatic expansion in mouse and human carriers of fragile X premutation alleles. // Human mutation. 2013. V. 34. N. 1. P. 157–166.
20. Kumari D., Lokanga R., **Yudkin D.**, Zhao X.N., Usdin K. Chromatin changes in the development and pathology of the Fragile X-associated disorders and Friedreich ataxia. // Biochimica et biophysica acta. 2012. V. 1819. N. 7. P. 802–810.