

МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ СПАРИВАНИЯ ГЕТЕРОХРОМАТИНОВЫХ РАЙОНОВ ХРОМОСОМ В ИНТЕРФАЗНЫХ ЯДРАХ КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ АТАКСИИ ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИИ

Юров Ю. Б.^{1,2}, Тагирова М. К.¹, Ворсанова С. Г.^{1,2,3}, Юров И. Ю.^{1,2,3}

¹ФБГУ Научный центр психического здоровья РАМН, Москва;

²ФБГУ «Московский НИИ педиатрии и детской хирургии Минздрава России», Москва;

³Московский Городской психолого-педагогический Университет, Москва, Россия, y_yurov@yahoo.com

В работе охарактеризованы особенности организации гомологичных хромосом в интерфазных ядрах нервных клеток коры и мозжечка головного мозга человека в норме и при атаксии телеангиэктазии (АТ) – генетическом заболевании, для которого характерна хромосомная нестабильность и прогрессирующая мозжечковая дегенерация. Показано, что в клетках мозга в норме и при патологии наблюдается феномен соматического спаривания (или ассоциации) хромосомных локусов, затрагивающих гетерохроматиновые участки разных хромосом, что свидетельствует о нарушении правила «хромосомных территорий» для гомологичных хромосом в клетках мозга. Впервые определены частоты соматического спаривания гетерохроматиновых районов разных хромосом человека в клетках коры и мозжечка головного мозга в норме и при АТ. Выявлены различия в частотах ассоциаций хромосомы 7 в мозжечке при АТ по сравнению с контролем, которые могут быть ассоциированы с нейрональной гибелью и нестабильностью определенных хромосомных локусов в клетках мозжечка при АТ.

Ключевые слова: атаксия телеангиэктазия (синдром Луи-Бар), соматическое спаривание хромосом, интерфазное ядро, флюоресцентная гибридизация *in situ* (FISH).

MOLECULAR-CYTOGENETIC ANALYSIS OF SOMATIC PAIRING AFFECTING HETEROCHROMATIC REGIONS OF CHROMOSOMES IN INTERPHASE NUCLEUS OF BRAIN CELLS IN ATAXIA-TELANGIECTASIA

Yurov Y. B.^{1,2}, Tagirova M. K.¹, Vorsanova S. G.^{1,2,3}, Iourov I. Y.^{1,2,3}

¹ Mental Health Research Center, RAMS, Moscow, Russia; ² Institute of Paediatrics and Paediatric Surgery, Ministry of Health, Moscow, Russia; ³ Moscow City University of Psychology and Education

In this work we described organization of homologous chromosomes in interphase nuclei of nerve cells of the human brain. The cortex and cerebellum of postmortem brain in normal and ataxia-teleangiectasia (AT) - a genetic disorder, characterized by chromosomal instability and progressive cerebellar degeneration, were analyzed by FISH. It was shown that the normal and pathological brain cells characterized by the phenomenon of somatic pairing (or association) of chromosomal loci that affect the heterochromatic regions of different chromosomes. This finding indicates for the violation of the rules of "chromosome territories" in the brain cells describing the specific positioning of homologous chromosomes in the nucleus. We have determined the frequency of somatic pairing of heterochromatic regions of different human chromosomes in the cells of the cortex and cerebellum in the normal and AT brain. We have detected the reduced rate of chromosome 7 pairing in the AT cerebellum compared with the control, which may be associated with cerebellar neuronal loss and instability of certain chromosomal loci in the cells of the degenerating cerebellum in AT.

Key words: ataxia telangiectasia, interphase nucleus, somatic chromosome pairing, FISH.

Введение. Особенности структурно-функциональной (ядерной) организации хромосом в клетках головного мозга человека в норме и при генетически обусловленных болезнях исследованы недостаточно подробно. Согласно общепринятой концепции, интерфазное ядро представляет собой упорядоченную структуру, где каждая хромосома расположена неслучайным образом, т.е. занимает специфическую хромосомную территорию [1,3,10].

Однако ранее было показано, что отличительной особенностью интерфазной организации генома в клетках головного мозга является феномен спаривания гетерохроматиновых участков разных хромосом, что нарушает правило «хромосомных территорий» [2,9,10]. В частности, Арнольдус с соавторами в 1989 году на интерфазных ядрах клеток аутопсийных образцов тканей головного мозга впервые выявил феномен соматического спаривания прицентромерного гетерохроматина гомологичных хромосом в клетках мозжечка. В этой работе с использованием прицентромерных ДНК зондов на хромосомы 1 и 7 было показано, что частота спаривания гомологичных хромосом достигала 80 % [2]. В дальнейшем было обнаружено, что феномен соматического спаривания гетерохроматиновых районов генома, которые содержат повторяющиеся сателлитные ДНК и не содержат кодирующие генные последовательности, по-видимому, характерен для высокодифференцированных постмитотических нервных клеток головного мозга [1,4,5,7,8]. Предполагается, что соматическое спаривание гомологичных хромосом участками эухроматина, обогащенного кодирующими последовательностями, может быть одним из механизмов эпигенетической регуляции транскрипции генов, т.е., по-видимому, является эпигенетическим феноменом [3,10]. Однако биологическая роль спаривания участков структурного гетерохроматина, состоящего из повторяющихся и некодирующих последовательностей сателлитных ДНК, до настоящего времени остается неизвестной. Этот эпигенетический феномен практически не исследован, и его роль в организации интерфазного ядра и функциональной активности в клетках мозга в норме и при патологии мозга не ясна. Кроме того, особенности соматического спаривания хромосом при патологии мозга до настоящего времени также не исследовали. Экспериментальной моделью для изучения организации интерфазного ядра при патологии мозга могут стать клетки аутопсийных образцов головного мозга при атаксии телеангиэктазии (АТ). При данной болезни происходит прогрессирующая нейродегенерация в мозжечке, клетки которого, как известно, характеризуется нарушением генетической и эпигенетической стабильности и повышенной частотой спаривания гетерохроматиновых районов хромосом [1,4,9].

Цель исследования. Изучить особенности структурно-функциональной организации хромосом в интерфазных ядрах клеток головного мозга на примере феномена соматического спаривания хромосом в норме и при атаксии телеангиэктазии (АТ) – генетически обусловленном моногенном заболевании, для которого характерна хромосомная нестабильность и прогрессирующая мозжечковая дегенерация.

Материалы и методы. В данной работе проведен молекулярно-цитогенетический анализ соматического спаривания гетерохроматиновых районов хромосом 1, 7, 8, 9, 11, 16,

17, 18 с применением различных вариантов метода интерфазной и количественной флюоресцентной гибридизации ДНК *in situ* или FISH [1,4,5,10]. Молекулярно-цитогенетические исследования проводились с использованием постмортальных тканей коры больших полушарий и мозжечка больных АТ и индивидуумов из контрольной группы, согласно ранее описанному протоколу [6]. Аутопсийные образцы тканей мозга (7 образцов пациентов с АТ и 7 контрольных образцов) были любезно предоставлены Банком тканей Мэрилэндского университета, США (Brain and Tissue Bank for Developmental disorders (NICHD), University of Maryland, USA). Исследованы интерфазные ядра постмортальных клеток головного мозга (35000 клеток образцов мозжечка больных АТ и 35000 клеток из образцов мозжечка в контроле). Статистический анализ проводили по *t*-критерию Стьюдента для независимых выборок.

Результаты исследования и их обсуждение. В данной работе впервые было проведено сравнительное исследование особенностей спаривания гетерохроматиновых участков генома человека в норме и при АТ. Мы использовали оригинальные методы MFISH/QFISH и ICS-MCB [1,7] с использованием ДНК проб на хромосомы 1, 9, 16, 18, 19 и X, специально разработанные для анализа постмитотических клеток мозга человека. Результаты анализа организации хромосом в интерфазных клетках головного мозга показали, что хромосомы занимают определенную территорию внутри ядра, которая тем не менее не является строго заданной. Иными словами, в отличие от неоднократно исследованных митотически активных клеток других тканей [3,7,8,9], расположение хромосом в интерфазных ядрах нервных клеток значительно варьировало [1,2,4]. Наиболее частыми областями, в которых локализовались хромосомы, являлась периферия и границы ядрышка, которые определялись, как область ядра, не окрашиваемая DAPI (краситель, взаимодействующий только с молекулами ДНК). Результаты молекулярно-цитогенетического анализа соматического спаривания гетерохроматиновых районов хромосом в клетках коры и мозжечка у больных АТ и в контроле представлены в таблицах 2 и 3. При исследовании соматического спаривания методом интерфазной и количественной FISH с прицентромерными ДНК зондами на хромосомы 1, 7, 8, 9, 11, 16, 17, 18 нами были определены частоты встречаемости соматического спаривания по каждой исследуемой хромосоме. При использовании метода интерфазной FISH соматическое спаривание в интерфазном ядре визуализируется благодаря свечению специфического зонда на хромосоме. Соматическое спаривание в интерфазных ядрах и истинная моносомия различаются более интенсивным и крупным сигналом в сравнении с сигналом при истинной моносомии [1,4]. Результаты анализа соматического спаривания представлены в таблицах 2–

3. Хромосомы, различия частот спаривания которых были статистически значимы ($p < 0,05$), выделены подчеркиванием.

Табл. 2. Результаты молекулярно-цитогенетического анализа соматического спаривания в клетках мозжечка у больных АТ и у здоровых индивидуумов (в процентах)

Хромосомы	Группа больных АТ		Контрольная группа здоровых индивидуумов		Значение величины p по t -критерию Стьюдента
	Среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (%)	Доверительный интервал, 95 %	Среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (%)	Доверительный интервал, 95 %	
1	40,5 $\pm$ 11,5	(95 % ДИ 29,7-51,2)	34,4 $\pm$ 9,8	(95 % ДИ 25,3-43,4)	$p=0,3$
<u>7</u>	6,6 $\pm$ 3,4	(95 % ДИ 3,5-9,7)	14,5 $\pm$ 7,3	(95%ДИ 7,7-21,2)	<u>$p=0,02$</u>
8	17,2 $\pm$ 7,0	(95 % ДИ 10,7-23,7)	29,8 $\pm$ 14,5	(95 %ДИ 16,4-43,4)	$p=0,06$
9	41,1 $\pm$ 10,1	(95 % ДИ 31,7-50,5)	37,7 $\pm$ 15,3	(95 %ДИ 23,6-51,9)	$p=0,63$
11	38,2 $\pm$ 7,5	(95 % ДИ 31,3-45,2)	38,5 $\pm$ 15,2	(95 %ДИ 24,5-52,6)	$p=0,96$
16	55,8 $\pm$ 11,4	(95 % ДИ 45,3-66,4)	57,3 $\pm$ 6,9	(95 %ДИ 50,9-63,7)	$p=0,77$
17	35,1 $\pm$ 10,8	(95 % ДИ 25,1-45,0)	39,3 $\pm$ 14,1	(95 %ДИ 26,2-52,3)	$p=0,54$
18	14,9 $\pm$ 10,2	(95 % ДИ 5,5-24,3)	18,5 $\pm$ 8,1	(95 %ДИ 11,1-26,0)	$p=0,47$

Частота соматического спаривания гетерохроматина некоторых хромосом была различна в клетках мозжечка в норме и при патологии. Например, при сравнении средних частот ассоциации хромосомы 7 в интерфазных клетках мозжечка в контрольной группе составило 14,5 $\pm$ 7,3 (95 % ДИ 7,7-21,2) и у больных АТ - 6,6 $\pm$ 3,4 (95 % ДИ 3,5-9,7), т.е. выявлены статистически значимые различия ($p=0,02$) (табл.2).

Табл. 3. Результаты молекулярно-цитогенетического анализа соматического спаривания в клетках коры головного мозга у больных АТ и у здоровых индивидуумов (в процентах)

Хромосомы	Группа больных с АТ		Контрольная группа здоровых индивидуумов		Значение величины p по t -критерию Стьюдента
	Среднее значение $\pm$ стандартное отклонение	Доверительный Интервал(ДИ) 95 %	Среднее значение $\pm$ стандартное отклонение	Доверительный Интервал (ДИ) 95 %	

	(%)		(%)		
1	30,5±11,2	(95 % ДИ 20,2-40,9)	39,5±12,8	(95 % ДИ 27,7-51,3)	p=0,19
7	4,3±0,9	(95 % ДИ 2,2-6,5)	8,1±4,4	(95 % ДИ 4,0-12,2)	p=0,19
8	15,5±1,9	(95 % ДИ 10,7-20,3)	18,3±10,9	(95 % ДИ 8,2-28,3)	p=0,56
9	15,6±2,9	(95 % ДИ 8,4-22,3)	25,0±10,2	(95 % ДИ 15,6-34,4)	p=0,07
11	17,1±6,2	(95 % ДИ 1,8-32,3)	12,3±5,5	(95 % ДИ 7,3-17,4)	p=0,48
16	48,2±3,4	(95 % ДИ 39,8-56,7)	55,4±14,1	(95 % ДИ 42,4-68,5)	p=0,28
17	19,4±4,2	(95 % ДИ 9,1-29,6)	24,3±11,7	(95 % ДИ 13,4-35,1)	p=0,44
18	8,1±1,2	(95 % ДИ 5,2-10,9)	14,0±5,7	(95 % ДИ 8,7-19,3)	p=0,03

Также статистически значимые различия наблюдали по хромосоме 18 ($p=0,03$) при сравнении средних частот ассоциации хромосом в интерфазных ядрах коры головного мозга в контрольной группе – $14,0 \pm 5,7$ (95 % ДИ 8,7-19,3) и у больных АТ – $8,1 \pm 1,2$ (95 % ДИ 5,2-10,9) (табл.3). Сравнительный анализ средних частот соматического спаривания по каждой хромосоме между корой головного мозга и мозжечком (данные приведены в табл.2 и 3) показал статистически значимые различия по хромосоме 11 ($p=0,001$) как в контроле, так и в группе больных АТ ($p=0,009$). В группе больных АТ статистически значимые различия между корой и мозжечком наблюдались также и для хромосомы 9 ($p=0,0001$).

Для большинства исследуемых хромосом не было выявлено статистически значимых различий по частоте соматического спаривания в коре и мозжечке как в норме, так и при АТ. Следовательно, можно предположить, что гетерохроматиновые участки гомологичных хромосом, обладая способностью к ассоциациям (или спариванию) в интерфазном ядре, подчиняются определенным закономерностям, образуя в целом строго воспроизводимый паттерн ассоциированных хромосомных территорий. Следовательно, гомологичные хромосомы в клетках мозга могут образовывать ассоциированные в области гетерохроматина "общие" для гомологичных хромосом территории или домены интерфазного ядра. Это свидетельствует в пользу относительной стабильности организации интерфазных хромосом в ядрах нервных клеток и о важном значении участков структурного гетерохроматина в организации внутреннего пространства интерфазного ядра. Тем не менее детальный анализ ассоциаций гетерохроматина выявил достоверные различия между некоторыми гомологичными хромосомами по частоте спаривания в нервных клетках как в норме, так и при АТ. При сравнении средних частот ассоциации хромосомы 7 в интерфазных

клетках мозжечка у контрольной группы – $14,5 \pm 7,3$ (95% ДЕ 7,7-21,2) и у больных АТ – $6,6 \pm 3,4$ (95% ДЕ 3,5-9,7) выявлены статистически значимые различия ($p=0,02$). Также статистически значимые различия наблюдали по хромосоме 18 ($p=0,03$) при сравнении средних частот ассоциации хромосом в интерфазных ядрах коры головного мозга контрольной группы – $14,0 \pm 5,7$ (95% ДЕ 8,7-19,3) и у больных АТ – $8,1 \pm 1,2\%$ (95 % ДЕ 5,2-10,9). Сравнительный анализ средних частот соматического спаривания по каждой хромосоме между корой головного мозга и мозжечком в группе контроля и больных АТ показал статистически значимые различия по хромосоме 11 ($p=0,001$) в группе контроля (среднее значение частоты ассоциаций по данной хромосоме для коры головного мозга – $12,3 \pm 5,5$ % (95 % ДИ 7,3-17,4) и среднее значение частоты ассоциации для мозжечка – $38,5 \pm 15,2$ % (95 % ДИ 24,5-52,6) в группе больных АТ значение по данной хромосоме соответствовало $p=0,009$ (среднее значение частоты ассоциаций по данной хромосоме для коры головного мозга – $17,1 \pm 6,2$ (95% ДИ 1,8-32,3) и среднее значение частоты ассоциации для мозжечка – $38,2 \pm 7,5$ % (95 % ДИ 31,3-45,2). В группе больных АТ статистически значимые различия наблюдались и для хромосомы 9 ($p=0,0001$). Среднее значение частоты ассоциации по данной хромосоме для коры головного мозга составило $15,6 \pm 2,9$ % (95 % ДИ 8,4-22,3), а среднее значение частоты ассоциации для мозжечка было $41,1 \pm 10,1$ % (95 % ДИ 31,7-50,5). Таким образом, можно заключить, что кора и мозжечок как в норме, так и при АТ имеют тканеспецифичные особенности спаривания гетерохроматина, что отражает эпигенетические различия в организации генома на клеточном уровне в мозге человека.

Предполагается, что соматическое спаривание гомологичных хромосом участками эухроматина, обогащенного кодирующими последовательностями, может быть одним из механизмов эпигенетической регуляции транскрипции генов [3,7,8,10]. Однако роль спаривания участков структурного гетерохроматина, состоящего из повторяющихся и некодирующих последовательностей сателлитных ДНК, до настоящего времени остается неизвестной. Кроме того, феномен соматического спаривания хромосом в клетках мозга в норме и при патологии до настоящего времени не исследовали. Адекватной моделью для изучения организации интерфазного ядра при патологии мозга являются клетки аутопсийных образцов головного мозга при АТ, так как при данной болезни происходит прогрессирующая нейродегенерация в мозжечке, который, как известно, характеризуется повышенной частотой спаривания гетерохроматиновых районов хромосом. В нашей работе впервые проведен подробный анализ особенностей соматического спаривания структурного гетерохроматина разных хромосом в коре и мозжечке постмортальных образцов мозга в норме и при АТ. Результаты анализа организации хромосом в интерфазных клетках

головного мозга показали, что хромосомы занимают определенную территорию, которая, тем не менее, не является строго заданной. Иными словами, в отличие от неоднократно исследованных митотических клеток [3,9], расположение хромосом в интерфазных ядрах клеток головного мозга в значительной степени варьировало. По результатам наших исследований особенностей соматического спаривания для хромосомы 1 в интерфазных ядрах клеток коры и мозжечка в норме и патологии выявлено, что процент спаривания гетерохроматиновых участков разных хромосом, включая хромосому 1, находится в интервале от 30–40 %. Полученные данные отличались от результатов Арнольдуса с соавторами [2], который показал, что частота соматического спаривания гетерохроматиновых участков хромосоме 1 достигала 82 % в мозжечке. Различие по частоте соматического спаривания хромосомы 1 нашего исследования от результатов Арнольдуса и его коллег [2] может быть следствием анализа различных нейронов разных слоев мозжечка, которые представлены различными типами нервных клеток (гранулярные нейроны и клетки Пуркинье). Эти типы клеток характеризуются различной функциональной активностью, которая может приводить к эпигенетическим вариациям в виде различий в частоте спаривания гомологичных хромосом. Для ответа на этот вопрос необходимы дополнительные исследования хромосом в различных типах нейронов как в нормальном мозге, так и при АТ.

Заключение. Таким образом, проведенный молекулярно-цитогенетический анализ особенностей соматического спаривания гетерохроматиновых районов в интерфазных ядрах нервных клеток позволил определить и сравнить частоты соматического спаривания гетерохроматиновых районов разных хромосом человека в клетках коры и мозжечка головного мозга в норме и при АТ – нейродегенеративном заболевании, характеризующимся мозжечковой дегенерацией. В работе впервые выявлены тканеспецифические различия в частотах ассоциаций хромосом в нервных клетках коры и мозжечка в норме и при АТ, а также особенности спаривания гетерохроматиновых участков хромосомы 7 при АТ, которые могут быть ассоциированы с нейрональной гибелью и нестабильностью определенных хромосомных локусов в клетках мозжечка. Исследования особенностей организации генома и эпигенома в нервных клетках значимы для понимания организации интерфазного ядра, эпигенетических изменений экспрессии генов, происходящих в мозге человека в норме и при генетически обусловленных патологических процессах.

Список литературы

1. Юров И. Ю., Ворсанова С. Г., Колотий А. Д., Демидова И. А., Берешева А. К., Кравец В. С., Монахов В. В., Куринная О. С., Тагирова М. К., Соловьев И. В., Юров Ю. Б. Мозаичная анеуплоидия в клетках головного мозга при атаксии-телеангиэктазии (синдроме Луи-Бар) // Медицинская Генетика. – 2008. – Т.7. – №7(73). – С.22-26.
2. Arnoldus EP, Peters AC, Bots GT, Raap AK, van der Ploeg M. Somatic pairing of chromosome 1 centromeres in interphase nuclei of human cerebellum. // Human Genet. – 1989. – Vol. 83(3). – P. 231-234.
3. Cremer T., Cremer M. Chromosome territories // CSH Perspect. Biol. – 2010; 2(3):a003889.
4. Iourov I. Y., Vorsanova S. G., Liehr T., Kolotii A. D., Yurov Y. B. Increased chromosome instability dramatically disrupts neural genome integrity and mediates cerebellar degeneration in the ataxia-telangiectasia brain // Human Molecular Genetics. – 2009. – Vol. 18 (14). – P. 2656-2669.
5. Iourov I. Y., Liehr T., Vorsanova S. G., Yurov Y. B. Interphase chromosome-specific multicolor banding (ICS-MCB): a new tool for analysis of interphase chromosomes in their integrity // Biomolecular Engineering. – 2007. – Vol. 24(4). – P.415-417.
6. Iourov I. Y., Vorsanova S. G., Pellestor F., Yurov Y. B. Brain tissue preparations for chromosomal PRINS labeling // Methods Mol Biol. – 2006. – Vol. 334. – P. 123-132.
7. Iourov I. Y., Vorsanova S. G., Yurov Y. B. Molecular cytogenetics and cytogenomics of brain diseases // Curr Genomics. – 2008. – Vol. 9(8). – P.452-465.
8. Iourov I. Y., Vorsanova S. G., Yurov Y. B. Intercellular genomic (chromosomal) variations resulting in somatic mosaicism: mechanisms and consequences // Curr Genomics. – 2007. – Vol. 7. – P.435-446.
9. Leitch A.R. Higher levels of organization in the interphase nucleus of cycling and differentiated cells // Microbiol Mol Biol Rev. – 2000. – Vol. 64(1) / P. – 138-152.
10. Vorsanova S. G., Yurov Y. B., Iourov I. Y. Human interphase chromosomes: a review of available molecular cytogenetic technologies // Molecular Cytogenetics. – 2010. – Vol. 3 (1). -1.

Рецензенты:

Голимбет Вера Евгеньевна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией клинической генетики ФГБУ Научный центр психического здоровья РАМН, г. Москва.

Востриков Виктор Михайлович, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клинической нейроморфологии ФГБУ Научный центр психического здоровья РАМН, г. Москва.