Решение задачи “Самостоятельный геном”

Выполнил участник команды “Крестоносцы” СГМУ им В.И. Разумовского
Соколов Алексей Владимирович

Формулировка задачи “Самостоятельный геном”

Миопатия Дюшена, нейроофтальмопатия Лебера и многие другие митохондриальные болезни обладают специфичностью развития и проявления в связи с особенностями размножения и жизнедеятельности митохондрий. Прогнозирование развития данных заболеваний осложнено из-за этих же особенностей. Предложите новые методы предсказания или диагностики какой-либо митохондриальной болезни.

Цели

1. Изучить особенности строения генетического аппарата митохондрий
2. Определить особенности митохондриальной наследственности
3. Изучить основные звенья патогенеза митохондриальных болезней
4. На основе данных о строении и функции митохондрий выделить основные звенья для качественного и количественного учета дефектов жизнедеятельности органеллы (точки приложения диагностических методов).
5. Предложить методику предсказания или диагностики какой-либо митохондриальной болезни

Процессы и механизмы, лежащие с основе проблемы

<u>Митохондриальный геном человека</u> –

37 генов,

16. 569 пар нуклеотидов

- 2 гена рибосомальной РНК
- 22 гена транспортной РНК
- 13 белок -кодирующих генов

<u>В настоящее время идентифицировано 3 типа мутаций</u>:

1. Точковые мутации белков, кодирующих мтДНК-гены *(mit-* мутации),
2. Точковые мутации мтДНК-тРНК-генов (sy/7-мутации) и
3. Крупные перестройки мтДНК (р-мутации).

Процессы и механизмы, лежащие с основе проблемы

Особенности митохондриальной наследственности:

- Материнское наследование
- мтДНК не содержит интронов, что обеспечивает высокую плотность генов (более 92% от мтДНК) по сравнению с ядерной ДНК.
- Мультикопийность геномов (учитывая тот факт, что клетки могут иметь в своём составе сотни и тысячи митохондрий, возможно существование до 10 тыс. копий мтДНК).
- Гетероплазмия (при возникновении мутаций часть генома остаётся идентичной, а другая – изменённой).
- Митотическая сегрегация
- Пороговый эффект (при минимальных нарушениях в первую очередь будут страдать наиболее энергозависмые органы и ткани (нервная система, головной мозг, глаза, мышцы).

Процессы и механизмы, лежащие с основе проблемы

- *Мутации в митохондриальной ДНК человека происходят в несколько раз чаще, чем в ядерной, поскольку:*

1. Геном митохондрий не защищен гистоновыми белками
2. Митохондрии поглощают более 90% клеточного кислорода; Образуется большое количество ДНК- повреждающих свободных радикалов. (возможная точка воздействия и контроля!)
3. Репарационные процессы в митохондриях менее совершенны, чем в ядре.

Процессы и механизмы, лежащие с основе проблемы

Процессы и механизмы, лежащие в основе проблемы

Доля ядерного и митохондриального генетического контроля различных ферментных комплексов:

- 1-й комплекс - NADH-убихинон-редуктаза (этот комплекс состоит из 25 полипетидов, синтез 6 из которых кодируется мтДНК)
- 2-й комплекс - сукцинат-убихинон-оксидоредуктаза (состоит из 5-6 полипептидов, включая сукцинатдегидрогеназу, кодируется только мтДНК);
- 3-й комплекс - цитохром С-оксидоредуктаза (переносит электроны от коэнзима Q на комплекс 4, состоит из 9-10 белков, синтез одного из них кодируется мтДНК)
- 4-й комплекс - цитохромоксидаза [состоит из 2 цитохромов (а и а3), кодируется мтДНК];
- 5-й комплекс - митохондриальная H^+-АТФаза (состоит из 12-14 субъединиц, осуществляет синтез АТФ).

Процессы и механизмы, лежащие с основе проблемы

<u>Последствия мутаций:</u>

1. Уменьшение синтеза АТФ
2. Нарушение кальциевого баланса клетки
3. Повышение количества ROS (reactive oxygen species)!!!

Процессы и механизмы, лежащие с основе проблемы

Из-за утечки в дыхательной цепи митохондрии постоянно продуцируют свободные радикалы на уровне 1–2 % поглощенного кислорода. Количество продукции радикалов зависит от мембранного потенциала митохондрий, на изменения которого влияет состояние АТФ-зависимых калиевых каналов митохондрий. Открытие этих каналов влечет за собой возрастание образования свободных радикалов, повреждение других белков митохондриальных мембран и мтДНК. ДНК митохондрий не защищена гистонами и хорошо доступна для радикалов, что проявляется в изменении уровня гетероплазмии.

Для каких митохондриальных болезней можно использовать предложенную методику?

Митохондриальные энцефаломиопатии :

1. ***Синдром Лея*** (подострая невротизирующая энцефаломиелопатия)
   Проявляется после 6 месяцев жизни нарастающей мышечной гипотонией, атаксией и нистагмом, пирамидными симптомами, офтальмоплегией и атрофией зрительных нервов. Часто отмечается присоединение кардиомиопатий и легкого метаболического ацидоза
2. ***Синдром Альперса***(прогрессирующая склерозирующая полидистрофия
   Дегенерация серого вещества мозга в сочетании с циррозом печени

Для каких митохондриальных болезней можно использовать предложенную методику?

3. Дефицит комлекса 1 (NADH:CoQ-редуктаза)
4. Дефицит комплекса 2 (сукцинат-CoQ-редуктаза)
5. Дефицит комплекса 3 (CoQ-цитохром С-оксидоредуктаза)
6. Дефицит комплекса (цитохром С-оксидаза)

- Фатальная инфантильная митохондриальная миопатия
- Доброкачественная инфантильная митохондриальная миопатия
- Синдром Менкеса (трихополиодистрофия)

7. Дефицит комплекса 5 (АТФ-синтетаза)

Описание предложенной методики

- 1. Метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР).
- 2. Метод хемилюминесценции (ХЛ)
- 3. Ингибиторный анализ

Описание методики №1 (ЭПР)

- Метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) основан на взаимодействии вещества с магнитным полем.
- При помещении парамагнетиков (нас интересуют свободные О-радикалы) в магнитное поле, парамагнетик втягивается в это поле. Это связано с наличием у парамагнетиков магнитных моментов. Магнитные моменты создаются неспаренными электронами.

Описание методики №1 (ЭПР)

Описание методики №1 (ЭПР)

Основными частями любого спектрометра ЭПР являются:

- а) магнит, создающий поле Н,
- б) источник радиочастотного излучения,
- в) система позволяющая подвести радиочастотное излучение к образцу и сконцентрировать это излучение на образце,
- г) схема, позволяющая зарегистрировать поглощение радиочастотного излучения.

Описание методики №1 (ЭПР)

Научная новизна метода

- Метод ЭПР является одним из методов радиоспектроскопии, или спектроскопии в радиочастотном диапазоне. Этот метод служит тонким инструментом исследования парамагнитных частиц.
- Метод позволяет определить концентрацию парамагнитных центров
- Парамагнитный центр является своеобразным зондом, дающим спектроскопические и структурные характеристики своего микроокружения. (Дыхательной цепи)

Описание методики №2 (ХЛ)

Сравнительный аналих ХЛ и ЭПР

- Метод хемилюминесценции (ХЛ) обладает тем преимуществом, что, во-первых, он обычно не связан с изменением хода процессов в растворах, клетках или даже целых тканях, где регистрируется свечение, а во-вторых, весьма чувствителен при обнаружении именно высокореакционных радикалов.

Описание методики №2 (ХЛ)

Методом ХЛ непосредственно определяется не концентрация радикалов, а скорость реакции, в которой они образуются.

Научная новизна метода

- Метод ХЛ регистрирует даже самые активные радикалы, концентрация которых в изучаемой системе может быть исчезающее мала, и в этом – его уникальность и преимущество перед другими методами обнаружения радикалов в химических и биологических системах.

Актуальность представленных идей диагностики

- Частота митохондриальных энцефалопатий определяется примерно как 1 : 11.000
- Общая частота митохондриальных заболеваний – как 1 : 8.000
- Возраст манифестации митохондриальных заболеваний сильно варьирует
- Смертность от митохондриальных заболеваний составляет 5-20% в год от даты манифестации.

Выводы

1. Для постановки диагноза митохондриального заболевания важен комплексный генеалогический, клинический, биохимический, морфологический и генетический анализ, что затруднено в силу двойственности генетического кодирования митохондриальных белков.
2. Выявлена точка приложения качественного и количественного учета дефекта жизнедеятельности митохондрий (наличие и объем “утечки” кислородных радикалов из дыхательной цепи.
3. С помощью прямых (Метод электронного парамагнитного резонанса) и непрямых (Метод хемилюминесценции) методов учета свободных радикалов предложена программа обследования больных с митохондриальными болезнями, связанными с дефектом дыхательной цепи.

Список литературы

1. Свободные радикалы и Клеточная хемилюминесценция (Ю. А. ВЛАДИМИРОВ, Е. В. ПРОСКУРНИНА *Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва 2003 г.)*
2. Д. Ингрэм Электронный парамагнитный резонанс в биологии. Изд-во «Мир», 1972.
3. Свободные радикалы в биологических системах. т.1, ст.88-175, 178-226. Изд-во «Мир»,1979.