

שם העבודה : חקר תסמונת רט באמצעות הגן Mecp2 כמודל להפרעת פיגור שכלי האחזזה

בכרומזום X

שנה : 2006

מס' קטלוגי : 509

שם המגיש : פטל-גליל יעל

חיבור לשם קבלת התואר "דוקטור לפילוסופיה" אוניברסיטת תל אביב, הפקולטה לרפואה ע"ש

סאקלר, החוג לגנטיקה מוליקולרית ולביוכימיה קלינית

תקציר המחקר

תסמונת רט היא הפרעה עצבית-התפתחותית חמורה ששכיחותה האוניברסלית כ 1 ל 10,000 עד 15,000 לידות של בנות. הצורה הקלאסית של תסמונת רט מאופיינת בעיקר באיחור התפתחותי ניכר החל מגיל 18-6 חודשים, בהידרדרות התפתחותית הכוללת איבוד כישורים מוטוריים ותקשורתיים, האטה בגדילת הראש, פיגור שכלי קשה, תנועות ידיים סטריאוטיפיות ופרכוסים. ההגדרה המורחבת של תסמונת רט כוללת חמש צורות לא טיפוסיות (אטיפיות) עם מאפיינים קלים או קשים לעומת ההגדרה הקלאסית: צורה קלה, צורה עם דיבור שמור, צורה עם הידרדרות מאוחרת, צורה מולדת וצורה עם פרכוסים מוקדמים. מרבית המקרים של תסמונת רט קלאסית (כ 85%) וחלק מהמקרים האטיפיים נגרמים ע"י מוטציות בגן MECP2 (methyl CpG binding protein 2) שממוקם ב Xq28. ב 2004 התגלתה בגן זה מסגרת קריאה חדשה על בסיס שחבור חליפי של האקסון השני. לאיזופורם החדש (MECP2_e1) קצה N שונה וארוך יותר מהאיזופורם הישן (MECP2_e2). MECP2_e1 שכיח יותר מ MECP2_e2 בדם ההיקפי אך במוח הבוגר היחס הפוך. רוב המקרים (99%) של חולות רט קלאסיות הם ספוראדיים ומרבית המוטציות הגורמות לתסמונת זו (<99%) מתרחשות באלל האבהי של הגן.

במרבית המחקרים אודות הקשר גנוטיפ-פנוטיפ בתסמונת רט, נמצאה עליה בחומרת המופע הפנוטיפי במוטציות קוטעניות לעומת מוטציות חלף (missense) ב MECP2, אולם לא נמצאה עקביות בין המחקרים ביחס למיקום המוטציות באתרים הפונקציונאליים של הגן. בין מוטציות חלף נמצאה שונות פנוטיפית ניכרת הנגזרת כנראה מאופי השינוי ומיקומו הספציפי. השפעת התפלגות האינאקטיבציה של כרומזום X (XCI) על הפנוטיפ הודגמה בעיקר במקרים קיצוניים מבחינה פנוטיפית או גנוטיפית כמו נשאות מוטציות אסימפטומטיות וחולות קלאסיות עם מוטציות קוטעניות מוקדמות מאוד. התפלגות XCI בדם, היא אקראית במרבית חולות רט אולם במקרים עם התפלגות נטויה יש העדפה לאינאקטיבציה של הכרומזום האבהי שהוא המוטנטי במרבית המקרים. בספרות יש מעט עדויות על הקשר בין התפלגות XCI לבין מיקום המופע הקליני על גבי הטווח הפנוטיפי הרחב של תסמונת רט, ביחס לסוגי מוטציות שונות.

החלבון MECP2 משתייך למשפחת חלבוני MBD (methylation binding domains) שמהווים חוליה מקשרת בין מתילציית DNA, לבין אצטילאזות של היסטונים וקו-רפרסורים. MECP2 כולל שני אזורים תפקודיים עיקריים: MBD שנקשר לדינוקליאוטידים CpG ממותלים בפרומוטרים ו TRD (Transcription Repression Domain) המגייס קו-רפרסורים הגורמים לשינוי מבנה הכרומטין דרך דאצטילציה של היסטונים.

מטרות

מטרתנו הראשונית היתה גיבוש ואפיון קליני וגנטי מקיף של עוקבת חולים המתאימים לתסמונת רט בהגדרתה המורחבת, כבסיס להמשך המחקר. במטרה ללמוד על השפעת מוטציות ספציפיות ודפוס XCI על חומרת הפנוטיפ של חולות תסמונת רט ביצענו מחקר שכלל אפיון פנוטיפי שיטתי של החולות ביחס למוטציות השונות ומיקומן הפונקציונאלי. כמו כן, ביקשנו לבדוק את השפעתה הפונקציונאלית הביוכימית של מוטציית חלף חדשה ותורשתית שגילינו ב TRD, במערכות ביטוי in

vitro ביחס למוטציות ידועות ב TRD. המטרה שבה מיקדנו את מירב מאמצנו, היא פיתוח גישה חדשנית לאבחון מוליקולרי של פגיעות ב MECP2 באמצעות בדיקת רמות הביטוי של גן זה בדם היקפי. גישה זו רלוונטית במיוחד כמענה לאבחון חולות רט ללא ממצאי מוטציות שחלקן, על פי רוב המחקרים הוא כ 15% מכלל חולות רט הקלאסיות ומרבית מחולות רט האטיפיות. שיטות

עוקבת החולים עם חשד קליני לתסמונת רט או הפרעות שיכולות להיקשר ב MECP2, כללה 54 חולות עם תסמונת רט קלאסית, 28 חולות עם תסמונת רט אטיפית ו 54 חולות וחולים עם אנצפלופתיה קשה או פיגור שכלי ותסמינים חלקיים של תסמונת רט. חיפוש מוטציות ב MECP2 נעשה באמצעות אנליזות רצף ישירות של מקטעי PCR שכיסו בחפיפה את ארבעת האקסונים ובדיקת (MLPA multiplex ligation probe amplification) לגילוי חסרים או דופליקציות גדולים באקסונים ואזור UTR'3. חולי רט ללא ממצאי מוטציות מקודדות, עברו גם אנליזות רצף של הפרומטר ואזורים שמורים באינטרונים. בנוסף ביצענו אנליזת מקטעים של קצה 5' של אינטרון 2 עקב רצף חוזרני. אזור UTR'3 נסרק בחלק מהחולות בשיטת DHPLC בגיבוי של קריאות רצף ישירות. שינויים תורשתיים נבדקו אל מול מאגרי המידע של SNPs ונסרקו במדגמי ביקורת בשיטת RFLP או באנליזות רצף ישירות.

התפלגות XCI נבדקה באמצעות תבחין HUMARA המתבסס על עיכול דנ"א גנומי באנזים רגיש למתילציה, הגברת אתר פולימורפי בגן AR הממוקם ב Xq11.2, והשוואת עוצמת הסיגנלים של תוצרי ההגברה עם ובלי העיכול האנזימטי. בכל המקרים עם התפלגות XCI לא אקראית נבדק גם אחד ההורים על מנת להתחקות אחר המקור ההורי של כל אחד מהכרומוזומים. לצורך בדיקת הקשר גנוטיפי-פנוטיפי, פותח סולם חומרת פנוטיפ המתבסס על שבעה מדדים הקשורים לתסמיני המחלה ומתאים לחולות מגיל 5 ומעלה. הציונים נקבעו על פי חוות דעתם של הרופאים העוקבים אחר החולות במסגרת מרפאת נויורולוגית ילדים בשיבא. ניתוחים סטטיסטיים של הנתונים שהתקבלו, בוצעו באמצעות תוכנת SPSS 120.

בדיקת רמות ביטוי MECP2 בדם נעשתה על פי דגימות רנ"א כולל שהופקו מדם היקפי של 15 חולות עם מוטציות, 12 חולות ללא ממצאי מוטציות ו 12 מתנדבות נורמאליות. דגימות אלו עברו ריאקציית reverse transcription ליצירת cDNA וריאקציית quantitative Real-Time PCR לכימות רמות הביטוי של שני האיזופורמים של MECP2, באופן יחסי לגן מדווח RNAaseP. בריאקציה זו השתמשנו בגלאי TaqMan המכוונים לצמתי אקסון-אקסון היחודיים לאיזופורמים השונים.

הערכה תפקודית של מוטציה חדשה שזוהתה ב (TRD (p.A275V) בוצעה באמצעות ביטוי בתרבית תאי אוסטאוסרקמה הומניים. המיקום התוך תאי של MECP2 עם מוטציה זו נבדק באנליזה מיקרוסקופית. מיצויי חלבונים היסטוניים מתרבית זו עברה אנליזת western לשם גילוי רמת האצטילציה של ההיסטונים H3 ו H4, באמצעות נוגדנים ספציפיים. הממצאים הושו לאלו שהתקבלו במערכות ביקורת של MECP2 תקין או עם מוטציות ידועות ב TRD. תוצאות

מבין 54 חולות רט קלסיות שנכללו בעוקבה, גילינו מוטציות בכ 83%, וב 20% מבין 28 חולות רט אטיפיות. מבין 54 החולים עם פיגור שכלי שאינם מתאימים להגדרת תסמונת רט, מצאנו מוטציית חלף נדירה ב (TRD (p.K304E) בילדה אחת עם הפרעת שפה ואנצפלוגרם לא תקין. 65% מהמוטציות שהתגלו היו 8% hotspots היו חסרים קטנים בקצה C ו 5% חסרים גדולים שכללו אזורים לא מקודדים והתגלו בשיטת MLPA. בין המוטציות המיוחדות שגילינו נמנות מוטציית חלף ספוראדית חדשה ב (MBD (p.D151E) בחולה עם תסמונת רט ודיבור שמור, מוטציה קוטענית חדשה מוקדמת מאוד (p.E55fs57X) בחולות רט קלאסית עם אקטיבציה מועדפת של כרומוזום X האימהי ומוטצית נדירה ספוראדית של חסר אתר שחבור אינטרוני (c.62+1delGT), שהתגלתה בשתי חולות רט קלאסיות. פרט למוטציה זו לא נמצאו מוטציות ספוראדיות לא מקודדות נוספות ב MECP2. בנוסף, נמצאו עוד 11 שינויים תורשתיים שחלקם ידועים כפולימורפיזמים והאחרים חדשים. אחד השינויים התורשתיים החדשים גרם להחלפת חומצה אמינית שמורה ב TRD (p.V275A). ממצא זה התגלה בחולה קלאסית ממוצא אתיופי ובאמה, על רקע דפוסי XCI נטויים בכיוונים הפוכים ונשלל ב 100 כרומוזומים תואמי מוצא.

בבדיקת הקשר גנוטיפי-פנוטיפי מצאנו שלחולות עם מוטציות קוטעניות יש פנוטיפ חמור יותר מלחולות עם מוטציות חלף. אולם, לא מצאנו הבדלים בין חולות עם מוטציות באתרים התפקודיים השונים של

החלבון. לעומת זאת, מוטציות חלף שכיחות (hotspots) נבדלו באופן ניכר אלו מאלו, בעוד המוטציות p.R106W, p.T158M שמוקמים ב MBD היו קשורות בפנוטיפים חמורים בדומה למוטציות עזר, מוטציות החלף p.R133C שב MBD ו p.R306C ב TRD היו קשורות בפנוטיפים קלים יחסית. בחולות רט עם אותה מוטציה, נמצאה שאקטיבציה נטויה של כרומוזום X לטובת הכרומוזום האימהי תורמת לביטוי פנוטיפי קל יותר.

במבחן ביטוי MECP2 בדם היקפי בקבוצת ביקורת, שכללה 12 נשים נורמאליות בגילאי 17-40, נמצא טווח ביטוי צר יחסית של שני האיזופורמים. לעומת זאת, מבין החולות עם מוטציות, נמצאו רמות ביטוי MECP2 נמוכות בחולות עם חסר אתר השחבור התורם באינטרון 1 ובחולות עם חסרים גדולים הכוללים חלקים מאזור UTR'3. בחולות עם מוטציות קוטעניות נמצאו רמות נמוכות גבוליות ואילו בחולות עם מוטציות חלף וחסרים לא קוטעניים נמצאו רמות ביטוי MECP2 בטווח הנורמאלי. במספר חולות רט ללא ממצאי מוטציות מקודדות נמצאו רמות ביטוי נמוכות בדומה לחולות עם מוטציות בקרה וחסרים גדולים. למרות זאת, לא הצלחנו לזהות בהן מוטציות באזורים לא מקודדים שמורים ב MECP2.

בבדיקת המוטציה החדשה (p.V275A) ב TRD במערכת ביטוי תאית של MECP2 רקומביננטי, נמצא מיקום צפוי של התוצר בגרעין אך לא נמצאה השפעה על רמות האצטילציה של ההיסטונים בדומה למה שנראה במערכת ביטוי של מוטציית החלף הידועה p.R306C הממוקמת אף היא ב TRD. לעומת זאת, בנוכחות המוטציה p.R255X הקוטעת את TRD, היתה רמת אצטילציה מוגברת של היסטון H3. סיכום ומסקנות

עוקבת חולות רט הארצית שהוקמה במסגרת זו עברה אבחון מעמיק מבחינה קלינית וגנטית ובכך הונחה תשתית לאבחון גנטי של תסמונת רט ולמחקרים נוספים בנושא זה. רמת גילוי מוטציות בגן MECP2, בקרב החולות הקלאסיות הייתה 83% וכ 20% מהמקרים האטיפיים, שרובם מהקצה המתון של טווח הפנוטיפים של התסמונת כגון חולות בעלות יכולת דיבור שמורה. מעבר לטווח הפנוטיפי המוגדר כתסמונת רט יכולות להתגלות מוטציות גם במקרים קלים שאינם נכללים בהגדרת תסמונת רט.

בבדיקת הקשר בין גנוטיפ לפנוטיפ מצאנו כי מוטציות חלף קשורות בפנוטיפ קל יותר לעומת מוטציות קוטעניות. כמו כן מצאנו כי מוטציות ספציפיות קשורות בדרגת חומרה פנוטיפית אופיינית ולכן לשם ניבוי מדויק יותר של חומרת הפנוטיפ יש להתבסס על הפרופיל האופייני לכל מוטציה בשילוב התפלגות XCI. לביסוס ממצאים אלו יש צורך בהרחבת המדגם באמצעות שיתופי פעולה עם עוקבות נוספות מחו"ל, כפי שאכן נעשה במסגרת פרויקט בינלאומי בו אנו לוקחים חלק. לבדיקת השפעת מוטציית חלף חדשה, p.V275A על תפקוד אזור ה TRD מדדנו את רמות אצטילציה של ההיסטונים במערכות ביטוי MECP2 בתאים הומניים, במקביל לחלבון תקין או עם מוטציות ידועות ב TRD. בבדיקה זו הראתה אצטילציה מוגברת של H3 כתוצאה ממוטצית עזר בלבד. מכאן שרמות האצטילציה של היסטונים אינן רגישות דיין בכדי לשיקף את ההשלכות התפקודיות של מוטציות חלף ב TRD.

תרומתה העיקרית של העבודה הנוכחית היא פיתוח שיטה חדשה לבדיקת ביטוי MECP2 בדם היקפי של חולים, אשר יכולה להצביע בעקיפין על נוכחות מוטציות עזר או חסרים בגן. מתוקף זה יש בכוחה של הבדיקה לסייע באבחון מוליקולרי של התסמונת. בבדיקת ביטוי MECP2 בדם היקפי, מצאנו כי תוצר השעתוק של MECP2_e2 רווח פי 8 יותר מאשר MECP2_e1, באופן המשקף את יחסי הביטוי של התוצרים החלבוניים. בחלק מחולות רט ללא ממצאי מוטציות מצאנו ירידה בביטוי MECP2 בדם היקפי בדומה לזו שנמצאה בחולות עם מוטציה באתר שחבור או חסרים הכוללים את UTR'3. ממצאים אלו יכולים להעיד על נוכחות מוטציות באתרים המבקרים את השיעתוק והשיחבור של הגן MECP2. באמצעות בדיקה זו נתאפשר לתת תימוכין ברמה המוליקולרית לחולות רט שאבחנתן התבססה עד כה על אבחנה קלינית. עם זאת, אין הבדיקה שוללת את האפשרות כי הפגיעה בביטוי MECP2 ומקרי רט ללא ממצאי מוטציות נובעים ממעורבותו של גן אחר.