

Встречаемость вставки NP196–197 (6 п.н.) в домене TAD2 гена SEBRA в российской популяции пациентов с ОМЛ по сравнению с контрольными группами.

Научный руководитель – Рисинская Наталья Владимировна

Кожневникова Яна Анатольевна

Студент (специалист)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины, Москва, Россия

E-mail: kozh.yana@mail.ru

Введение

Белок C/EBP α представляет собой фактор транскрипции, кодируемый геном SEBRA и участвующий в контроле пролиферации и дифференцировки миелоидных предшественников. C/EBP α состоит из C-концевого ДНК-связывающего домена bZIP (basic leucine zipper) и двух доменов трансактиваации TAD1 и TAD2 на N-конце. Мутации SEBRA обнаруживаются в 5-14% случаев острого миелоидного лейкоза (ОМЛ). Пациенты с ОМЛ с биаллельными/двойными мутациями SEBRA входят в «благоприятную» группу, которая определяет стратегию лечения. Было показано, что вставка в 6 п.н. в домене TAD2 (NP196-197), приводящая к появлению в белке четырех гистидин-пролиновых повторов вместо трех, распространена как среди пациентов с ОМЛ, так и в здоровой популяции; однако на российской популяции таких исследований не проводилось.

Цели: сравнить встречаемость вставки 6 п.н. в домене TAD2 гена SEBRA у пациентов с ОМЛ, здоровых людей контрольной группы и у пациентов с гемобластозом немиелоидного происхождения (хроническим лимфоцитарным лейкозом, ХЛЛ) в российской популяции; разработать тест-систему для подтверждения расположения вставки в области гистидин-пролиновых повторов.

Материалы и методы

В исследование были включены 120 здоровых людей из контрольной группы, 117 пациентов с de novo ОМЛ и 100 пациентов с ХЛЛ, проходящих лечение в Национальном Медицинском Исследовательском Центре гематологии (Москва, Россия). Геномная ДНК была выделена из образцов костного мозга/периферической крови, взятых во время постановки диагноза; у пациентов с ОМЛ мы также анализировали образцы, взятые после лечения. Тестирование образцов ДНК мы проводили с помощью ПЦР с флуоресцентно меченым прямым (F) праймером FAM-5'-CCGGCTACCTGGACGGCAGG-3' и обратным (R1) праймером 5'-CGTTGCTGTTCTTTGTCCACCGACTTCTT-3' [T Benthaus et al, 2008] с последующим фрагментным анализом (на генетическом анализаторе ABI3130, Thermofisher Scientific, США). Сравнение частот встречаемости вставки у пациентов проводилось с использованием критерия χ^2 Пирсона. Для верификации вставки 6 п.н. как NP196-197 нами была предложена система праймеров: прямого F [T Benthaus et al, 2008] и обратного R 5'-TGCGGGTGC GGGTGC GGGT-3' (был подобран нами непосредственно на сайт tandemных гистидин-пролиновых повторов (см. рисунок 1).

Результаты

Вставка 6 п.н. в домене TAD2 была обнаружена у 7 из 117 (6%) пациентов с ОМЛ, у 9 из 120 (7,5%) здоровых контролей и у 10 из 100 (10%) пациентов с ХЛЛ; различия между этими группами статистически не значимы ($\chi^2 = 1,234$, $df = 2$, $p = 0,540$). Во всех исследованных нами образцах вставка обнаруживалась в гетерозиготной форме. У всех пациентов с ОМЛ с обнаруженной во взятых до лечения образцах вставкой 6 п.н. эта

вставка также была обнаружена после лечения. С помощью предложенной нами системы праймеров было подтверждено, что вставка находится в сайте гистидин-пролиновых повторов во всех случаях.

Заклучение

Встречаемость вставки 6 п.н. в домене TAD2 (HP196-197ins) одинакова у пациентов с ОМЛ и контрольных групп и совпадает с данными по европейской популяции. Более того, эта вставка у пациентов с ОМЛ сохраняется после лечения, что свидетельствует о ее наследственной природе. Следовательно, выявленный полиморфизм не следует учитывать при определении группы риска и стратегии лечения.

Иллюстрации

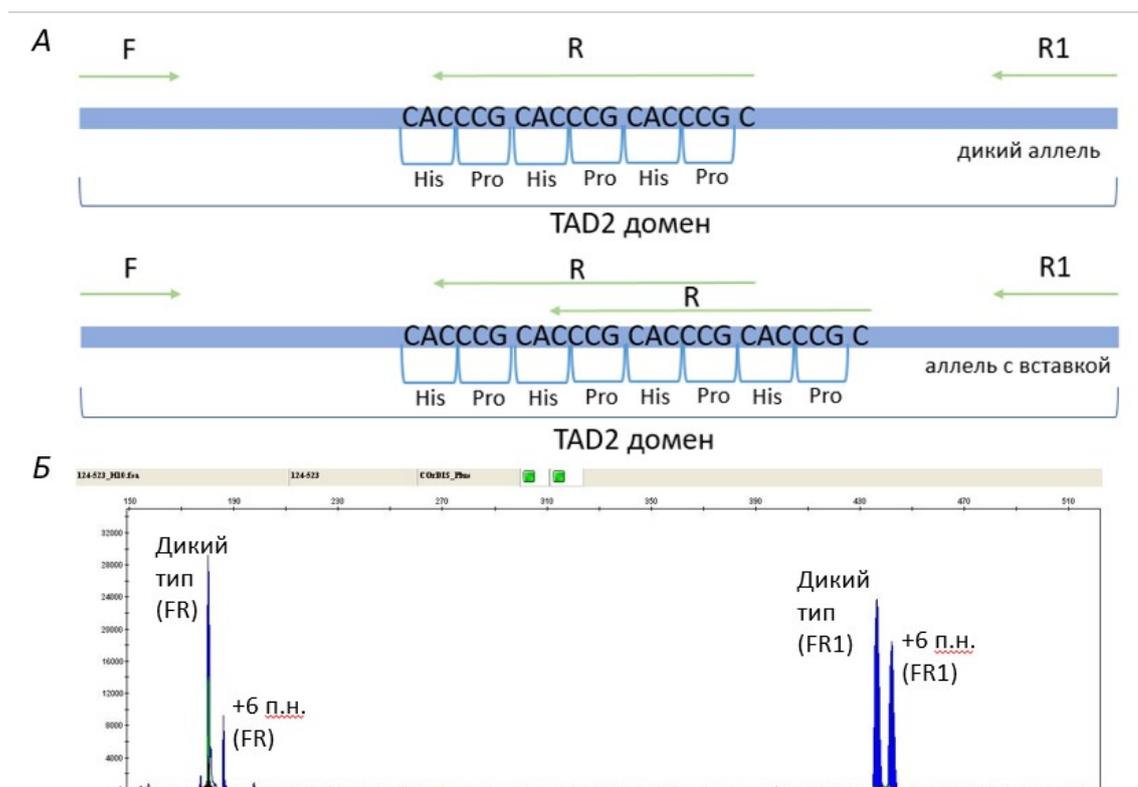


Рис. 1. Рис. 1. А: схема работы праймеров для домена TAD2; последовательности праймеров см. в тексте. Б: электрофореграмма образца со вставкой 6 п.н. в домене TAD2. Правая пара пиков – результат амплификации всего домена TAD2 (праймеры FR1). Левая пара пиков – результат амплификации области вставки (праймеры FR). Подбор специфичных праймеров затруднен, так как вставка представляет собой дубликацию уже трижды повторяющейся последовательности. Нами подобран праймер, комплементарный и дикому аллелю, и аллелю со вставкой. В случае наличия вставки HP196–197 мутантный аллель дает при амплификации два продукта (180 и 186 п.н), дикий аллель дает продукт длиной 180 п.н. В результате на электрофореграмме образуются два пика с соотношением высоты 3:1. В случае наличия вставки в 6 п.н., но в другом месте между праймерами F и R, на электрофореграмме будет образовано два пика одинаковой высоты; после праймера R– один пик.