

ГЕНЕТИКА ЛЮДИНИ ТА МЕДИЧНА ГЕНЕТИКА

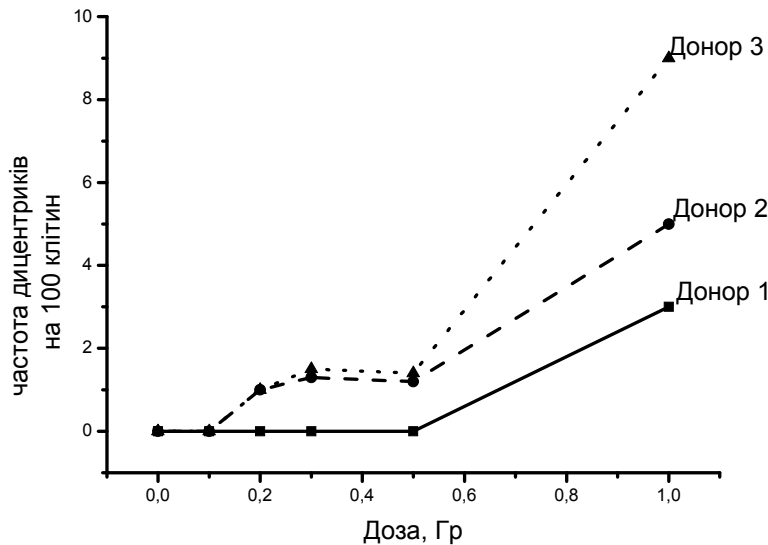


Рис. 2 Частота дицентричних хромосом в залежності від індивідуальної радіочутливості донорів

Література

1. Снигирева Г. П., Богомазова А. Н., Новицкая Н. Н., Хазинс Е. Д., Рубанович А. В. Биологическая индикация радиационного воздействия на организм человека с использованием цитогенетических методов // Метод. рекомендации. – 2007. 32 с.
2. Демченко О. М., Дьоміна Е. А., Петунін Ю. І., Савкіна М. Ю. Индукция генетических повреждений за дії малих доз іонізуючої радіації // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. – 2009, Вип. 1-2. С. 52-63
3. Дьоміна Е. А., Дружина М. О., Рябченко Н. М. Індивідуальна радіочутливість людини. – К.:2006. 125 с.

Вперше встановлено, що при побудові калібрувальних дозових кривих необхідно враховувати індивідуальну радіочутливість людини (G_2 assay). Запропонований методичний підхід доцільно використовувати з метою удосконалення біологічної дозиметрії на основі аналізу аберацій хромосом.

Впервые установлено, для описания дозовых кривых необходимо учитывать индивидуальную радиочувствительность человека (G_2 assay). Предлагаемый методический подход целесообразно использовать с целью усовершенствования биологической дозиметрии на основе анализа абераций хромосом.

For the first be settled for description doses curves it is necessary to consider individual sensitivity to radiation (G_2 assay) of the person. The offered methodical approach is expedient for using for the purpose of improvement of biological dosimetry on the basis of the analysis of aberrations of chromosomes.

ДИБКОВ М.В., МАЛЮТА С.С., ТЕЛЕГЕСЬВ Г.Д.

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
03680 м. Київ, вул. акад. Заболотного 150,
e-mail: m.v.dybkov@imbg.org.ua

МУТАЦІЯ V617F ГЕНА *jak2* ЯК МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИЙ МАРКЕР У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНІ МІЄЛОПРОЛІФЕРАТИВНІ ЗАХВОРЮВАННЯ .

Одним із важливих аспектів сучасної генетики є використання генетичних маркерів у різних галузях науки і практики, зокрема, у медицині. Молекулярно-генетичні методи діагностики різних захворювань все ширше використовують як при встановленні діагнозів, так і для контролю ефективності лікування. Це значно прискорює встановлення діагнозу та підвищує його достовірність.

Хронічні мієлопроліферативні захворювання (ХМПЗ) — гетерогенна група неопластичних захворювань, які характеризуються множинною гіперплазією гемопоетичних клітин кісткового мозку. До них відносять хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ), хронічну нейтрофільну лейкемію, хронічну еозинофільну лейкемію, справжню поліцитемію, есенціальну тромбоцитемію, ідіопатичний мієлофіброз та хронічні мієлопроліферативні захворювання, некласифіковані.

Ще кілька років тому лише для хронічної мієлоїдної лейкемії було описано чіткий цитологічний маркер — Ph-хромосому [t(9; 22)(q34; q11)], та ,відповідно, молекулярний маркер – злитий ген *bcr/abl*, на виявленні якого за допомогою ЗТ-ПЛР базується переважна більшість діагностичних методик.

Оскільки для решти ХМПЗ донедавна молекулярно-генетичних маркерів не було описано то їх називали Ph-негативними хронічними мієлопроліферативними захворюваннями.

Але в 2005 році було опубліковано роботи [1–4], у яких було описано мутацію в чотирнадцятому екзоні гена *jak2* (який локалізовано на дев'ятій хромосомі), що призводила до заміни G→T і, відповідно, валіну на фенілаланін у позиції 617. Дана мутація V617F виявляється у 95% хворих на справжню поліцитемію, приблизно у 50% хворих на есенціальну тромбоцитемію та у 20% ідіопатичний мієлофіброз. Вважають, що на функціональному рівні мутації в псевдокіназному домені призводить до порушення регуляції кіназної активності. Це призводить до конститутивної активації тирозинкінази JAK2, і, як наслідок, до збільшення кількості еритроцитів, тромбоцитів та гранулоцитів.

В 2008 році було запропоновано ревізію класифікації та діагностичних критеріїв для мієлопроліферативних захворювань [5–6] в якій мутацію V617F було включено як важливий діагностичний критерій. Так у разі її виявлення виключають вторинну поліцитемію, реактивний тромбоцитоз чи вторинний фіброз кісткового мозку (secondary bone marrow fibrosis) тощо.

У дані роботі наводиться метод виявлення мутації V617F за допомогою ЗТ-ПЛР та прямого секвенування.

Матеріали і методи

У роботі використовували зразки крові хворих (за інформованої згоди), що проходили лікування в гематологічних клініках м. Києва. РНК виділяли згідно [7]. Зворотну транскрипцію проводили в об'ємі 30 мкл у суміші, що містила буфер для зворотної транскриптази, 1 мМ dNTP, 0,1 мкг праймера Random Hexamer Primer, 300 од зворотної транскриптази RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas), 20 од РНАзіну та 1–3 мкг РНК. Реакцію проводили при 42 °С протягом 1 год і зупиняли прогріванням при 70 °С 10 хв. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в об'ємі 30 мкл продовж 30 циклів (94°С – 35 с, 55°С – 35 с, 72°С – 45 с.) з використанням буферу для ПЛР, 10 pmol праймерів J1F (5'–CACC AACATTACAGAGGCCTAC–3') та J1R (5'–GCCAGGATCACTAAGTTTGATG–3'), 200мкМ dNTP та 2 мкл суміші для отримання кДНК. Для проведення другого етапу ПЛР відбирали по 0,5 мкл реакційної суміші ПЛР1 і проводили синтез із використанням праймерів J2F (5' – CGGTCAACTGCATGAAACAG – 3') та J2R 5' – TTGGCACATACATTCCCATG – 3').

В якості позитивного контролю використовували праймери для 18s rRNA (5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3' та 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'). Продукти ампліфікації аналізували в 2% агарозному гелі.

Отримані продукти ПЛР було очищено та сиквенувано з використанням праймерів J2F, J2R на автоматичному сиквенаторі. Отримані послідовності було проаналізовано для допомоги програм BioEdit та BLAST.

Результати та обговорення

Хоча виявлення мутації V617F можливе і без проведення зворотної транскрипції ми вважаємо за доцільне використання саме ЗТ-ПЛР, оскільки отриману на першому етапі аналізу кДНК можна також використовувати для одночасного виявлення злитого гена *bcr/abl* [8] та інших можливих змін. Тому даний підхід уніфікує початкові процедури дослідження зразків крові.

кДНК синтезували з використанням у якості затравки розсіяного праймеру d(NTP)₆, що дозволяє проводити виявлення не тільки мутації в гені *jak2*, а й інших генетичних аномалій, насамперед злитого гена *bcr/abl*.

Використання двоетапної “гніздової” ПЛР викликано двома причинами. Після першого етапу ПЛР кількість ампліфікатів недостатня для сиквенування. Але окрім примноження ампліфікату завдяки використанню внутрішніх праймерів забезпечується додаткова специфічність діагностики. Оскільки праймери підібрано на різні екзони гена *jak2*, а він має протяжні інтрони, домішки ДНК не можуть впливати на проведення ЗТ-ПЛР.

Сиквенування ампліфікатів проводили на автоматичному сиквенаторі з використанням праймерів (роздільно) J2F та J2R. Сиквенування обох ланцюгів ампліфікату слугує для високої надійності виявлення мутації та виключення випадкових артефактів при встановленні послідовності. Мутація V617F, яка як згадували вище, призводить до заміни валін та фенілаланін є наслідком точкової мутації G→T, тобто зміни кодону GTC на TTC.

На рис. 1 представлено електрофореграму продуктів ПЛР та результати сиквенування ампліфікатів хворого П., 1950 року народження, яких хворіє на справжню поліцитемію з 1998 р. Як видно з рисунку на денситограмі спостерігаються два піки, що відповідають нуклеотидам С та А в позиції 2343 (наведено сиквенс зворотного ланцюга, нумерація згідно послідовності мРНК *jak2* NM_004972.2 Homo sapiens Janus kinase 2), тобто виявляється як нормальний CAG кодон, так і мутантний AAG. Тобто було виявлено мутацію V617F, що є молекулярним підтвердженням поставленого діагнозу “справжня поліцитемія”.

Таким чином, запропонована методика виявлення мутації V617F за допомогою ЗТ-ПЛР та прямого сиквенування може використовуватись для молекулярно-генетичної діагностики хронічних мієлопроліферативних захворювань.

Література

1. Baxter E.J., Scott L.M., Campbell P.J., et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders // *Lancet* 2005.– V.365, N9464.– P. 1054–1061.
2. Kralovics R., Passamonti F., Buser A.S., et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders // *N Engl J Med* 2005.– V.352, N17.– P. 1779–1790.
3. Levine R.L., Wadleigh M., Cools J., et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis // *Cancer Cell* 2005.– V.7, N4.– P.387–397.
4. Zhao R., Xing S., Li Z., et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera // *J Biol Chem*. 2005.– V.280, N24.– P. 22788–22792.
5. Tefferi A., Vardiman J.W. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms // *Leukemia* 2008.– V.22.– P. 14–22.

6. *Spivak J.L., Silver R.T.* The revised World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocytosis, and primary myelofibrosis: an alternative proposal // *Blood* 2008.– V.112, N2.– P. 231–239.
7. *Chomczynski P., Sacchi N.* Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Analyt. Biochem.* 1987.– V.162.– P. 156–159.
8. *Телегеев Г.Д., Дибков М.В., Божко М.В. Демиденко Д.В., Малюта С.С., Третьяк Н.М., Бондар М.В.* Моніторинг хронічного мієлолейкозу за допомогою молекулярно-біологічних методів (методичні рекомендації) // Республіканський центр науково-медичної інформації., Київ, 1997, 20 стор., іл.

Резюме

Мутація V617F гена *jak2* є важливим діагностичним критерієм при хронічних мієлопроліферативних захворюваннях. Запропоновано методику для її виявлення за допомогою ЗТ-ПЛР та прямого секвенування.

Мутація V617F гена *jak2* является важным диагностическим критерием при диагностике хронических миелопролиферативных заболеваний. Предложена методика ее выявления с помощью ОТ-ПЦР и прямого секвенирования.

V617F mutation *jak2* gene is an important diagnostic criterion for the diagnosis of chronic myeloproliferative disorders. The method of detection using RT-PCR and direct sequencing was proposed.

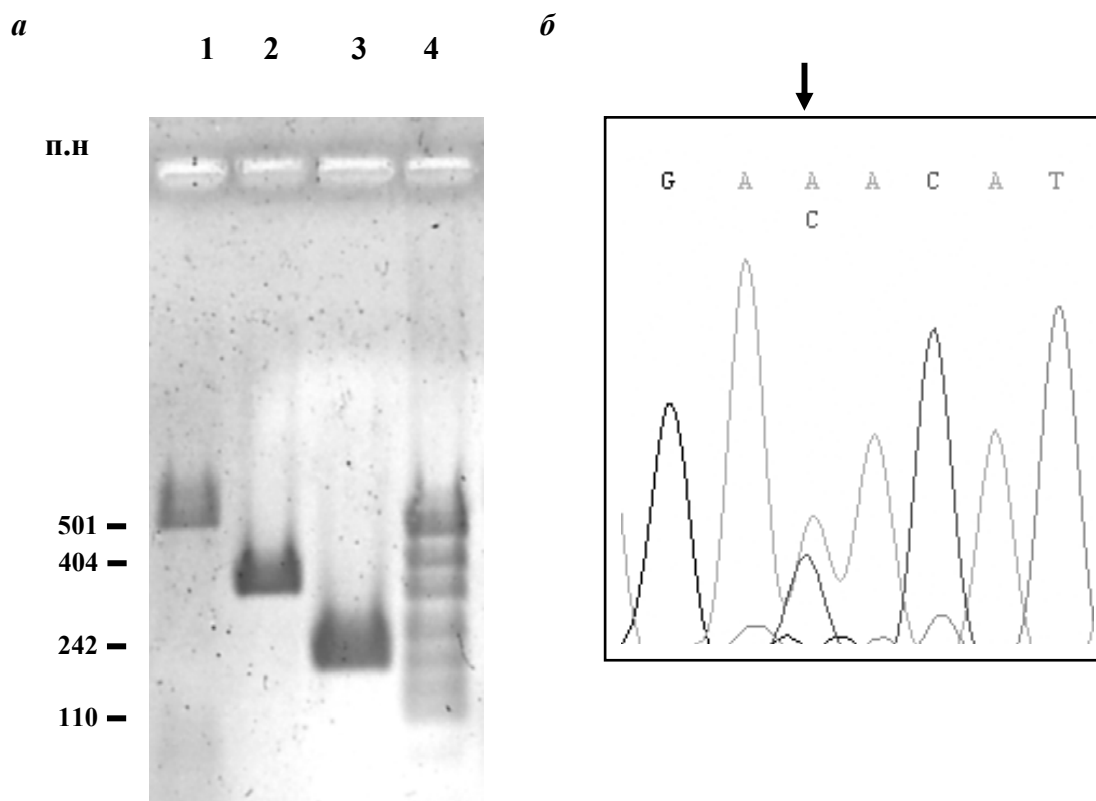


Рис. 1. Електрофореграма (а) та денситограма секвенсу послідовності (б) продукту ПЛР, що був отриманий при дослідженні крові хворого П.

а) 1 – продукт ПЛР, який отримано з використанням праймерів J1F та J1R; 2 – продукт ПЛР, який отримано з використанням праймерів J2F та J2R; 3 – ампліфікована ділянка 18s rRNA (позитивний контроль); 4 – маркер молекулярних мас pUC19/MspI.

б) Стрілкою вказано піки, що відповідають нуклеотидам С/А, які вказують на наявність мутації V617F.