Секция «Экспериментальные исследования»

Делеции и точковые мутации гена ABL1 как причина резистентности к ингибиторам тирозинкиназ у пациентов с хроническим миелолейкозом

Научный руководитель – Абдуллаев Адхамжон Одилович

Нестерова О.Ю.[1], *Михайлов И.А.*[1]

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

Введение

Хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) - это миелопролиферативное заболевание, обусловленное злокачественной трансформацией клеток-предшественников миелоидного ростка гемопоэза, что связывают с появлением филадельфийской хромосомы (результат реципрокной транслокации (9;22)). В результате формируется химерный ген BCR-ABL и белок - нерецепторная тирозинкиназа с повышенной активностью, которая запускает пролиферацию и опухолевую трансформацию клеток.

Появление ингибиторов тирозинкиназ (ИТК) произвело революцию в терапии ХМЛ. Но у части пациентов развивается вторичная резистентность. Точковые мутации - одной из главных причин резистентности к ИТК, но остается малоизученной роль делеций и инсерций в её формировании. В нашей работе мы исследовали делецию экзона 7 гена ABL1, и ее влияние на развитие резистентности к ИТК у пациентов с ХМЛ.

Цель

Изучить влияние наличия точковых мутаций и делеции экзона 7 гена ABL1 на формирование резистентности к ИТК у пациентов с ХМЛ.

Материалы и методы

Были использованы образцы крови 50 пациентов с ХМЛ с резистентностью к ИТК 1-ого поколения иматинибу. Выделение ядросодержащих клеток проводилось лизирующим буфером для эритроцитов с центрифугированием при 3000 об./мин. Из супернатанта выделялась тотальная РНК с использованием набора реагентов РИБО-золь-D. Обратная транскрипция проводилась с использованием набора реагентов РЕВЕРТА-L в ПЦР-амплификаторе.

Для амплификации необходимого участка гена проводили ПЦР в два этапа: на первом амплифицировали фрагмент длиной 2514 пар нуклеотидов (exon 13 BCR - exon 11 ABL1), на втором - более короткий фрагмент гена ABL1 (731 п.н.).

Для очистки проводили электрофорез ПЦР-продукта в 1,5% агарозном геле. После элюции из геля проводили постановку сиквенсовой реакции и прямое секвенирование по Сенгеру.

Для измерения количества кДНК мутантных клонов использовался фрагментный анализ. Постановка лигирования и амплификации осуществлялась с использованием набора реагентов компании «Синтол».

Результаты

После секвенирования и анализа всех последовательностей ДНК были отобраны кДНК пациентов с подозрением на делецию экзона 7. После постановки фрагментного анализа

с праймерами на район делеции у всех этих пациентов была выявлена кДНК двух клонов опухолевых клеток: с нормальной длиной гена ABL1 и с делецией экзона 7.

Для определения направления эволюции опухолевых клонов у пациентов с делецией провели исследование образцов кДНК от 2 до 5-летней давности (секвенирование и фрагментный анализ). У одного из пациентов была обнаружена ранее неописанная точковая мутация c.844G[U+02C3]C (p.E282Q).

Выводы

Делеция экзона 7 гена ABL1 и точковая мутация c.844G[U+02C3]C (p.E282Q) способствуют формированию резистентности к ИТК у пациентов с ХМЛ. Опухолевые клоны, несущие делецию, склонны к быстрой прогрессии и приобретению сочетанных точковых мутаций, усиливающих резистентность.