

компоненты гетерохроматина, такие как гетерохроматиновые белки, не обязательно вызывают долгосрочные эпигенетически наследуемые изменения структуры хроматина эухроматинового гена, но могут создавать неоптимальные условия для работы его транскрипционного аппарата. При этом, поскольку состояние транскрипционного аппарата гена динамически меняется в ходе онтогенеза, чувствительность к влиянию гетерохроматина также может изменяться. Аналогичные результаты, полученные на разных модельных системах, свидетельствуют в пользу универсального характера предполагаемых закономерностей.

Работа была поддержана грантом РФФИ №14-04-32308 мол_а.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ NOTCH1 У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЦИТАРНЫМ ЛЕЙКОЗОМ (ХЛЛ)

Шевчук А.С., Румянцев А.М., Стругов В.В., Стадник Е.А., Зарицкий А.Ю.

Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр,

Санкт-Петербург, Россия

spbshevchuk@gmail.com

Хронический лимфоцитарный лейкоз - это болезнь, связанная с накоплением большого числа лимфоцитов в крови, селезенке, печени и лимфоузлах. Благодаря развитию современных технологии секвенирования были выявлены новые генетические маркеры, ассоциированные с ХЛЛ. Одним из таких маркеров является ген NOTCH1, который кодирует трансмембранный белок, функционирующий как рецептор и регулятор транскрипции. Подавляющее большинство мутаций в гене NOTCH1 наблюдается в участке, кодирующем внутриклеточный PEST домен. Около 80% данных мутаций представлено делецией двух нуклеотидов 7544-7545delCT.

На первом этапе работы был проведен поиск мутаций в гене NOTCH1 у пациентов с ХЛЛ. Для выявления делеции с.7544-7545delCT в PEST домене гена NOTCH1 использовали метод аллель-специфичной ПЦР. В качестве контроля использовали праймеры, специфичные к последовательности дикого типа. Детекцию флуоресценции осуществляли с помощью флуоресцентно меченых зондов.

При проведении секвенирования в ходе трёх отдельных ПЦР реакций амплифицировались частично перекрывающиеся фрагменты, охватывающие весь PEST домен гена NOTCH1. ПЦР-фрагменты очищали с помощью электрофореза в агарозном геле, после чего проводили секвенирование обеих цепей полученных фрагментов. Анализ полученных хроматограмм и нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы UGENE, а также алгоритмов Clustal Omega и Blast.

Были исследованы образцы от 76 пациентов. Делеция с.7544-7545delCT была выявлена у 11 (13%) пациентов. Применение секвенирования позволило выявить у одного из пациентов наличие редкой мутации с.7298delT.

На втором этапе работы фрагмент гена NOTCH1, кодирующий внутриклеточный домен (NICD) был амплифицирован и встроен в плазмиду pTZ57R/T. С помощью методов сайт-направленного мутагенеза в состав данной последовательности были внесены замены, соответствующие выявленным мутациям, в частности делеция с.7544-7545delCT. Полученные плазмиды будут использованы для создания клеточных линий, характеризующихся сверхэкспрессией последовательностей, кодирующих мутированные варианты NICD домена. С помощью этих моделей будет исследовано влияние наличия мутаций в гене NOTCH1 на экспрессию Notch-регулируемых генов.