



УДК 577.215.037

НОВЫЕ ТОЧКИ РАЗРЫВА ТРАНСЛОКАЦИИ t(9;22)
ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ МИЕЛОЛЕЙКОЗЕ© 1999 г. А. В. Мисюрин[#], В. Л. Сурин, А. Ф. ТагиевГематологический научный центр РАМН,
125167, Москва, Новозыковский пр., 4а

Поступило в редакцию 18.03.98 г. Принято к печати 05.10.98 г.

Изучено 9 новых точек разрыва (участков слияния) генов *BCR* и *ABL* в составе химерного онкогена *BCR/ABL* при транслокации t(9;22) у больных хроническим миелолейкозом. Впервые обнаружены совпадающие точки разрыва у разных больных в генах *BCR* и *ABL*. Фрагменты ДНК, содержавшие точки разрыва *BCR/ABL*, были амплифицированы при помощи ПЦР-прогулки на основе модификации метода ПЦР со случайным отжигом праймеров, названной обратной праймерной прогулкой.

Ключевые слова: t(9;22); точки разрыва; хронический миелолейкоз; ПЦР-прогулка.

Реципрокная транслокация t(9;22) приводит к появлению химерного онкогена *BCR/ABL*, являющегося причиной хронического миелолейкоза (ХМЛ) [1]. Копии нормальных генов *BCR* и *ABL* содержатся в 22-х и 9-х хромосомах соответственно. Из каждой пары 22-х и 9-х хромосом в транслокацию t(9;22) и в образование химерного онкогена *BCR/ABL* вовлекается только по одной хромосоме. Поэтому геномная ДНК больных ХМЛ содержит одновременно как копии нормального гена *BCR*, так и химерного *BCR/ABL* [1]. Известные последовательности *BCR* в гене *BCR/ABL* прерываются точкой разрыва и продолжают в неизвестные последовательности *ABL* [2]. Варианты химерного онкогена *BCR/ABL* различаются между собой по тому, в каких именно интронах генов *BCR* и *ABL* при транслокации t(9;22) возникают разрывы. При ХМЛ разрывы в последовательностях гена *BCR* чаще всего случаются в 13-м и 14-м интронах, а в гене *ABL* – в протяженной (свыше 300 т.п.о.) 5'-области перед экзоном а2 [3]. Чтобы разобраться в молекулярных основах возникновения транслокации t(9;22), необходимо иметь информацию о первичной структуре в области точек разрыва для разных вариантов гена *BCR/ABL*. Нами была отобрана группа из 14 больных ХМЛ, у которых тип мРНК *BCR/ABL* (e13a2) указывал на предположительную локализацию точек разрыва в 13-м интроне *BCR* длиной 717 п.о. [2].

Для решения задачи данной работы – анализа точек разрыва при t(9;22) у больных хроническим миелолейкозом – мы несколько модифицировали известный метод ПЦР со случайным отжигом праймеров (random PCR) [4]. Новая модификация, названная обратной праймерной прогулкой, со-

четает сильные стороны других ранее опубликованных вариантов метода ПЦР со случайным отжигом праймеров, позволяющих осуществлять ПЦР-прогулки [5–9]. Применяли два набора праймеров, комплементарных 13-му (e13) экзону и 13-му интрону гена *BCR*, откуда совершалась прогулка в сторону предполагаемой точки разрыва (рис. 1):

1-й набор – 13-й экзон гена *BCR*
внешний D1 5' GGAGCTGCAGATGCTGACCAAC
внутренний Br2 5' CCACAGCATTCGGCTGACCA
2-й набор – 13-й интрон гена *BCR*
внешний Br22 5' TTGCATTCACCTGTTGCACAT
внутренний Br23 5' CAGCATACGCTATGCACATGTG

Реакционная смесь на каждом этапе ПЦР содержала в объеме 25 мкл 50 мМ Трис-НСl (рН 8.9

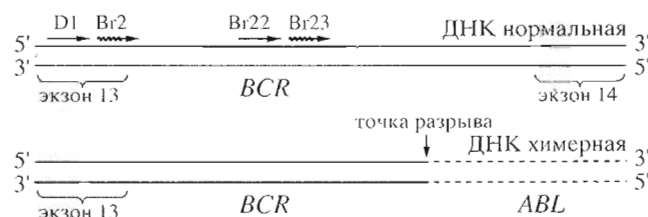


Рис. 1. Схема расположения праймеров, использованных для обратной праймерной прогулки, в области 13-го экзона и 13-го интрона гена *BCR* и химерного онкогена *BCR/ABL*; внешние праймеры изображены ровными стрелками, внутренние – волнистыми; *BCR*-последовательности представлены в виде сплошных линий, в гене *BCR/ABL* отмечена точка разрыва, за которой лежат последовательности гена *ABL* в виде штриховых линий.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 214-50-80; e-mail: and@blood.ru).

при 25°C), 16 мМ сульфат аммония, 1 мМ $MgCl_2$, 10 мкМ EDTA, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 170 мкг/мл БСА, смесь четырех основных dNTP (0.1 мМ каждый) и 2 ед. акт. *Taq*-полимеразы.

На первом этапе (ПЦР1, рис. 2) по 0.2 мкг геномной ДНК амплифицировали при участии 7.5 пмоль одного из внешних праймеров D1 или Br22. При этом проводили 10 циклов с параметрами 94°C – 1 мин, 60°C – 1 мин, 72°C – 3 мин (линейное накопление *BCR*-содержащей матрицы); затем – еще 20 циклов с параметрами 94°C – 1 мин, 37°C – 1 мин, 72°C – 3 мин (обратная праймерная прогулка).

На втором этапе (ПЦР2, рис. 2) проводили 30 циклов ПЦР-амплификации (94°C – 1 мин, 60°C – 1 мин, 72°C – 3 мин), используя в качестве матрицы 2.5 мкл реакционной смеси предыдущего этапа (ПЦР1). Применяли пару праймеров: 2 пмоль праймера, который был в работе при ПЦР1 (D1 или Br22), и 2 пмоль ^{32}P -меченого внутреннего праймера (Br2 для D1 или Br23 для Br22) с удельной активностью 5000 Ки/ммоль. На этом этапе работы за счет образования структур типа “сковороды” происходила супрессия амплификации фрагментов ДНК, концы которых имели места посадки внешних праймеров. ПЦР-продукты разделяли в 6% ПААГ (рис. 3а) и радиоавтографировали (рис. 3б). Участки гелей, соответствовавшие проявившимся на пленке наиболее ярким полосам, вырезали, содержащуюся в них ДНК выделяли и секвенировали методом Сэнгера с использованием *Taq*-полимеразы, как описано нами ранее [10]. Эти фрагменты имели относительно небольшие размеры (рис. 3а, 3б), что упрощало их полное секвенирование. Мы наблюдали и более протяженные фрагменты длиной свыше 1 т.п.о., но выход их был весьма незначителен, что может быть связано, в частности, с невысокой процессивностью использовавшейся *Taq*-полимеразы. Отмеченный на рис. 3а, 3б фрагмент, соответствующий, как показало его секвенирование, нормальному гену *BCR*, отсутствует у ряда больных (В, С, D), что может объясняться полиморфностью 13-го интрона *BCR*, возможной амплификацией онкогена *BCR/ABL* или существенно более эффективной посадкой прогулочного праймера в области последовательностей *ABL*.

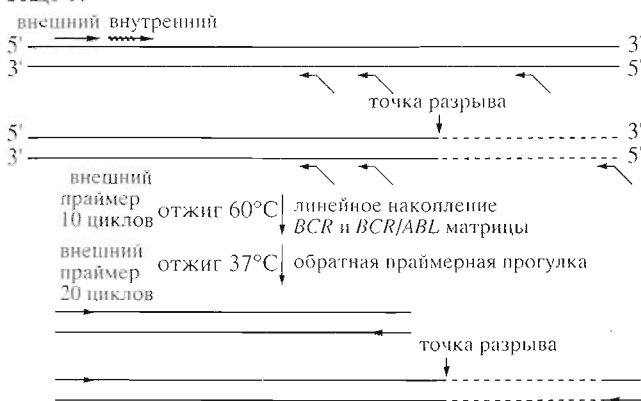
Интересно, что у больных В и С фрагменты с разной электрофоретической подвижностью имеют идентичную первичную структуру. По всей вероятности, они представляют собой разные конформационные варианты одной и той же последовательности.

Использование для прогулки праймеров D1 и Br22 позволило для 9 из 14 обследованных больных хроническим миелолейкозом установить точки разрыва t(9;22) (обозначены ниже стрелкой):

Больные XML	13-й интрон <i>BCR</i>	последовательности <i>ABL</i>
A	gtccacacacacccccaccca↓	gagagaattgatacctgtgc
B	tgccgtgtattgtgaaccaa ↓	gtatgatctctggccaggfg
C	cccacatcccacatcacccc ↓	tcttgccataacaaactcat
D	cacacccccacacatccca↓	tctcccctcctttgtagaaa
E	acacacacccccacacatc ↓	agggaaatgagagaattgata
F	gcacatgtgtccacacacac ↓	aaccaaacctagtcacacag
G	cacatgtgtccacacacacc ↓	agggaaatgagagaattgata
H	cacatgtgtccacacacacc ↓	taggaagcttttaagagca
I	cacacccccacacatccca↓	tgaacactgttattgtcaat

Точки разрыва в последовательностях *ABL* совпали у больных Е и G, а у больного А точка разрыва была сдвинута всего на шесть нуклеотидов относительно ее положения у больных Е и G. Такое совпадение обнаружено впервые: все точки разрыва при t(9;22), найденные ранее, локализованы в разных участках гена *ABL* [2, 11, 12]. Впервые нами наблюдались совпадения точек разрыва и в области *BCR*: у больных D, I и у больных G, H; кроме того, положение точки разрыва у больного F сдвинуто на один нуклеотид по сравнению с положением точек разрыва в *BCR* у больных G и H.

ПЦР1:



ПЦР2:

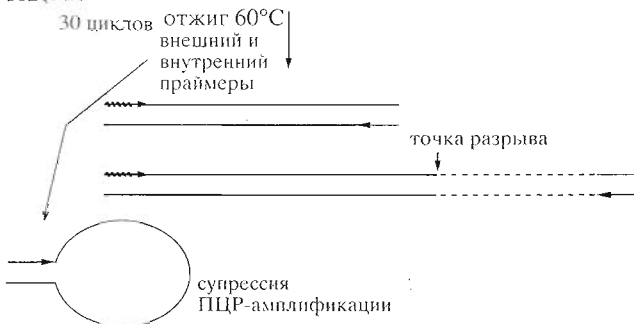


Рис. 2. Схема обратной праймерной прогулки: изогнутыми стрелками показан внешний праймер, отжигающийся на альтернативных местах посадки с неполной гомологией. Обозначения как на рис. 1.

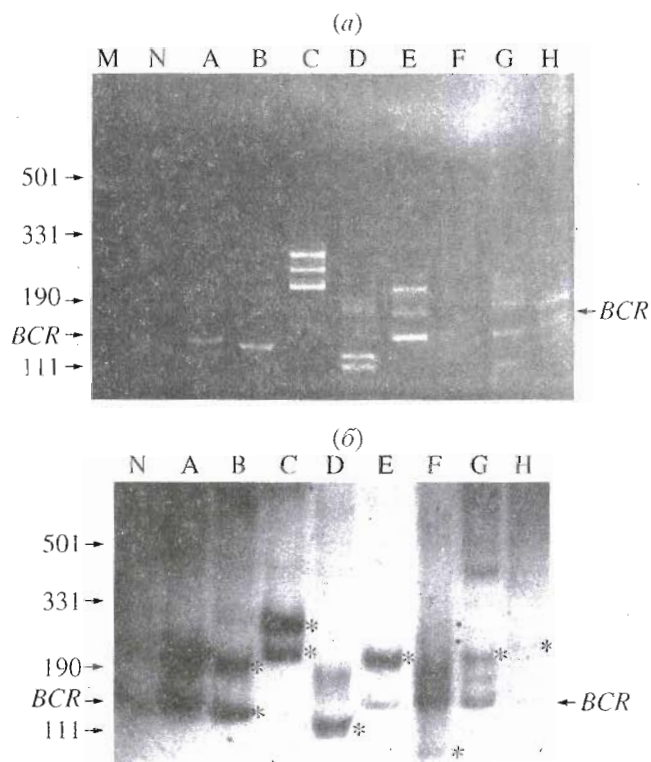


Рис. 3. Фракционирование в 6% ПААГ фрагментов ДНК, полученных в результате обратной праймерной прогулки. (а) – Гель, окрашенный бромистым этидием: М – рUC19/HpaII, N – нормальный донор, А–Н – больные хроническим миелолейкозом. (б) – Радиоавтограф того же геля: время экспонирования – 1 ч, звездочками отмечены фрагменты ДНК, которые по данным секвенирования соответствуют вариантам химерного онкогена *BCR/ABL*.

Работа финансировалась программой “Геном человека” (грант 18/96).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Groffen J., Heisterkamp N. // *Baillieres Clinical Haematology*. 1988. V. 1. P. 983–999.
2. Sowerby S.J., Kennedy M.A., Fitzgerald P.H., Morris C.M. // *Oncogene*. 1993. V. 8. P. 1679–1683.
3. Melo J.V. // *Leukemia*. 1996. V. 10. P. 751–756.
4. Parker J.D., Rabinovitch P.S., Burmer G.C. // *Nucl. Acids Res.* 1991. V. 19. P. 2887–2890.
5. Trueba G.A., Johnson R.C. // *BioTechniques*. 1996. V. 21. P. 20.
6. Park B.Ch., Kim J.S., Lee D.-S., Byun S.M. // *BioTechniques*. 1996. V. 21. P. 592–594.
7. Dominguez O., Lopez-Larrea C. // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22. P. 3247–3248.
8. Screaton G.R., Bangham R.M., Bell J.I. // *Nucl. Acids Res.* 1993. V. 21. P. 2263–2264.
9. Ge Y., Charon N.W. // *Gene*. 1997. V. 189. P. 195–201.
10. Tagiev A.F., Surin V.L., Gol'tsov A.A., Lukianenko A.V., Solov'yev G.Ya., Gulieva E.A., Plutalov O.V., Kaboev O.K., Mamedova T.A., Dadasheva T.S., Rustamov R.Sh., Schwartz E.I., Berlin Yu.A. // *Human mut.* 1993. V. 2. P. 152–154.
11. Zhang J.G., Goldman J.M., Cross N.C.P. // *Brit. J. Haematol.* 1995. V. 90. P. 138–146.
12. Mills K.I., Sproul A.M., Olgilvie D., Elvin P., Leibowitz D., Durnett A. // *Leukemia*. 1992. V. 6. P. 481–483.

New Breakpoints of Translocation t(9;22) in Chronic Myeloleukemia

A. V. Misyurin[#], V. L. Surin, and A. F. Tagiev

Research Center of Hematology, Russian Academy of Medical Sciences,
Novozykovskii prospekt 4a, Moscow, 125167 Russia

Nine new breakpoints (junction sites) of the *BCR* and *ABL* genes in a chimeric oncogene *BCR/ABL* from translocation t(9;22) were studied in patients with chronic myeloleukemia. It was demonstrated for the first time that some breakpoints in these genes are identical in different patients. DNA fragments containing *BCR/ABL* breakpoints were amplified using the PCR walking technique. The approach, called reverse primer walk (RPW), is based on a modification of the PCR method with a random annealing of primers.

Key words: t(9;22); breakpoints; chronic myeloleukemia; PCR walking

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 214-5080; e-mail: and@blood.ru.