

Ю.В. Пудикова, А.В. Виноградов
ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ RNA-SEQ ДЛЯ ТИПИРОВАНИЯ
ГЕНОВ HLA-B

Центральная научно-исследовательская лаборатория
Уральский государственный медицинский университет
Екатеринбург, Россия

Y.V. Pudikova, A.V. Vinogradov
EXPERIENCE OF USING RNA-SEQ TO DETERMINE THE HLA-B GENES
Central Research Laboratory
Ural State Medical University
Ekaterinburg, Russia

E-mail: yu_pudikova@mail.ru

Аннотация. В статье представлены первые результаты исследования по разработке панели генов для выявления генетических предикторов неблагоприятного течения болезни Бехтерева.

Annotation. The article presents the first results of research on the development of the panel of genes to identify genetic predictors of adverse course of ankylosing spondylitis.

Ключевые слова: анкилозирующий спондилоартрит; генетические предикторы; RNA-секвенирование.

Keywords: ankylosing spondylitis; genetic predictors; RNA-seq.

Центральную позицию в группе спондилоартритов занимает идиопатический или первичный анкилозирующий спондилит (спондилоартрит) – болезнь Бехтерева. Истинная распространенность спондилоартритов в популяции неизвестна, что связано с отсутствием общепринятых диагностических критериев [2]. По данным различных источников, среди европейцев HLA-B27 встречается в среднем у 7-10% населения и у 90-95% пациентов с анкилозирующим спондилитом [1].

Важно, что стойкая потеря трудоспособности в среднем наступает спустя 15,6 лет от начала болезни, а болезнь начинается в молодом возрасте (15-30 лет). В терапевтической тактике данного заболевания необходимо обратить внимание на предикторы тяжелого течения, которые включают большое число клинико-рентгенологических, лабораторных и генетических факторов (наличие HLA-B27), большинство из которых можно оценить лишь в разгаре заболевания.

Разработка панели генов с помощью технологии полногеномного секвенирования транскриптома (RNA-seq) позволит выявить наличие аллельных вариантов и точечных мутаций гена HLA-B27, что в дальнейшем

станет основой для создания тест-системы для выявления генетических предикторов неблагоприятного течения ИАС.

Цель исследования –произведение анализа тотальной рибонуклеиновой кислоты ядродержащих клеток образцов периферической крови с помощью технологии полногеномного секвенирования транскриптома (RNA-seq) для выявления аллельных вариантов и определения наличия точечных мутаций генов.

Материалы и методы исследования

В 2014-2015 году на базе ГБУЗ СО «СОКБ № 1» произведен отбор проб периферической крови и костного мозга у 2 пациентов. Из клеток периферической крови выделяли тотальную РНК и секвенировали на полногеномном секвенаторе HiSeq 2000 (Illumina, США) в соответствии с протоколом производителя. Получены ~42,4 млн. 100-нуклеотидных односторонних последовательностей с Q-оценкой ≥ 15 по системе оценки качества секвенирования PHRED. Выравнивание последовательностей проводили по алгоритму COBWeb (Strand, США) относительно референсного генома человека hg19 и базы последовательностей транскриптов RefSeq. После выравнивания идентифицирована геномная локализация для ~31,9 млн. последовательностей (~73%), неидентифицированные последовательности исключены из анализа.

Результаты исследования и их обсуждение

Точечные мутации определены в одном целевом гене (HLA-B) и представлены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты детекции точечных мутаций в гене HLA-B (score 1000,00)

Эк- зон	Мута- ция	Зигот- ность	DbSNP Id	Кол-во ридов	Изме- нения в белке	Позиция замены
1	C/T	Гетеро	rs1050459	13570	A>A	5-5
	A/G	Гетеро	rs1050458	12918	M>T	4-4
	C/T	Гетеро	rs9266207	349	-	-
	C/T	Гетеро	rs1050459	13570	A>A	5-5
	A/C	Гетеро	rs9266206, rs151341074, rs151341075	8664	L>R	2-2
2	C/G	Гетеро	rs1050517	5797	T>T	55-55
	C/T	Гетеро	rs1131204	10392	A>T	93-93
	C/G	Гетеро	rs1065386, rs151341176, rs151341177,rs151341178, rs151341179	11822	N>K	87-87
	A/C	Гетеро	rs1131215	11188	D>Y	98-98
	A/T	Гетеро	rs713031	3342	S>T	48-48
	C/T	Гетеро	rs1050529	10823	A>T	65-65

*I Международная (71 Всероссийская) научно-практическая конференция
«Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения»*

	C/T	Гетеро	rs1050486	4381	V>M	36-36
	G/T	Гетеро	rs1071817	10598	Q>K	94-94
	C/T	Гетеро	rs67385961, rs9266178	13414	E>K	69-69
	C/G	Гетеро	rs1131212	10395	Q>H	94-94
	C/T	Гетеро	rs1131213, rs71533898	10024	A>T	95-95
	A/T	Гетеро	rs1050518	5977	Q>L	56-56
	C/T	Гетеро	rs67090363, rs1050388	10261	S>N	104-104
	C/T	Гетеро	rs1050570, rs143633217, rs151341173	12156	N>D	87-87
	A/G	Гетеро	rs2596492	5460	Y>H	33-33
	C/T	Гетеро	rs9266179, rs151341121, rs200186034	12866	R>R	68-68
	G/T	Гетеро	rs67090363, rs2308559	10332	N>K	104-104
	C/T	Гетеро	rs1050556, rs139850307, rs151341142, rs151341144, rs151341145	17598	P>P	74-74
	G/T	Гетеро	rs9266184	3477	S>S	48-48
	G/T	Гетеро	rs1071816	12039	Y>S	91-91
	A/C	Гетеро	rs1131170	4987	S>A	35-35
	TCC/ TCT/ TTC/ TTT		rs9281379, rs41562914, rs67385961, rs9266178, rs9266179, rs151341121, rs200186034	12849	-	-
3	T	Гомо	rs709055	13325	D>N	138-138
	A/C	Гетеро	rs697742	13347	R>L	180-180
	C/G	Гетеро	rs74202381, rs1140412	9944	S>R	121-121
	A/T	Гетеро	rs707912, rs151341293, rs151341294	11732	E>V	176-176
	A/T	Гетеро	rs41541519, rs140029568, rs151341272	11738	T>S	167-167
	A/C	Гетеро	rs41551018	11219	W>L	171-171
	A/T	Гетеро	rs4997052	13489	Y>F	140-140
4	A/G	Гетеро	rs1050747	17503	G>G	231-231
	A/G	Гетеро	rs709052	29019	T>T	252-252
	C/T	Гетеро	rs41541216	26807	R>R	258-258
	C/T	Гетеро	rs41545916	27457	R>G	263-263
5	C/T	Гетеро	rs1131500	14842	V>I	306-306
8	-/C	Гетеро	-	11726	-	-

Мутации были представлены одной делецией, которая привела к сдвигу рамки считывания; 9 синонимичными и 28 несинонимичными нуклеотидными заменами. Среди замен нуклеотидов почти поровну встречались варианты

транзиции и трансверсии – 19 и 18 случаев соответственно.

Выводы

1. Проанализированы частота, структурные особенности и прогностическое значение мутаций гена HLA-B методом RNA-seq. Проведен анализ оригинальных исследований и материалов банков данных (OMIM, GeneCards, NCBI, Ensembl Genome Browser, HGNC) для выявления прогностического значения молекулярных повреждений в исследуемых генах.

2. Произведено полное геномное секвенирование, в результате выявлено 37 мутаций в целевом гене. При детальном анализе полученных данных выявлено, что мутации в целевом гене были представлены одной делецией, которая привела к сдвигу рамки считывания; 9 синонимичными и 28 несинонимичными нуклеотидными заменами. Среди замен нуклеотидов почти поровну встречались варианты транзиции и трансверсии – 19 и 18 случаев соответственно.

3. В результате разработан оптимальный алгоритм детекции мутантных форм гена семейства HLA-B с помощью метода полногеномного секвенирования.

Литература

1. Лапин С.В. Лабораторная диагностика аутоиммунных заболеваний: методическое руководство / С.В. Лапин, А.В. Мазина, Т.В. Булгакова / Санкт-Петербург: Издательство СПбГМУ, 2011. 39 с.

2. Моисеев В.С. Внутренние болезни. Учебник в 2 т. – 3-е изд., испр. и доп./ В.С. Моисеев, А.И. Мартынов, Н.А. Мухин / М.: Гэотар-МЕДИА, 2013. Т. 2. 896 с., ил.

3. Ребриков Д.В. NGS: высокопроизводительное секвенирование: научное издание / Д.В. Ребриков, Д.О. Коростин, Е.С. Шубина / М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. 232 с., ил.