

Разработка методов оценки мутационного статуса гена *flt3* и уровня экспрессии генов *cebpa* и *baalc*, включенных в патогенез острого миелобластного лейкоза

Сабурова И.Ю., Горбунова А.В., Слободнюк К.Ю., Горчакова М.В., Зуева Е.Е. д.м.н., Чередниченко Д.В. к.м.н., Эмануэль В.Л. проф., д.м.н., Зарайский М.И. д.м.н., Центр лабораторной диагностики СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, г. Санкт-Петербург

Development the method of *flt3* gene status and *cebpa* and *baalc* genes expression assesment in pathogenesis of acute myeloid leukemia

Saburova I.Y., Gorbunova A.V., Slobodnyuk K.U., Gorchakova M.V., Zueva E.E., Cherednichenko D.V., Emanuel V.L., Zaraiski M.I.

Резюме

Введение: Согласно классификации ВОЗ 2008 года некоторые генетические поломки являются специфичными для ОМЛ. Однако, диагностика ОМЛ без выявленных цитогенетических нарушений представляет достаточно серьезную проблему и требует разработки дополнительных верификационных технологий. Цель: исследование мутационного статуса гена *FLT3* и оценка экспрессии генов *BAALC* и *CEBPA*, как дополнительных прогностических факторов при ОМЛ. Методы: В данной работе было обследовано 92 пациента с ОМЛ, 30 пациентов с ОЛЛ и 32 донора. Диагноз ОМЛ был верифицирован с помощью методов многоцветной проточной цитометрии, морфологии, цитохимии. Было проведено определение мутаций *FLT3-ITD* и *FLT3-D835Y* и оценка экспрессионного статуса генов *CEBPA* и *BAALC*. Результаты: Мутации *FLT3-ITD* и *FLT3-D835Y* выявлены в 16% и 7% случаев ОМЛ соответственно. Уровень мРНК гена *BAALC* у пациентов с ОМЛ был повышен в два раза по сравнению с уровнем в контрольной группе; тогда как уровень мРНК гена *CEBPA* был снижен в два раза по отношению к группе сравнения. Изменения экспрессии данных генов у пациентов с ОЛЛ отклонялся от группы сравнения в незначительной степени. Заключение: Выявление уровня экспрессии генов *CEBPA* и *BAALC* может служить дополнительными диагностическим маркером при оценке случаев цитогенетически нормально-го ОМЛ. Прогностическое значение экспрессионного статуса этих генов будет изучено в дальнейших исследованиях.

Ключевые слова: мутации *FLT3*; экспрессия *CEBPA* и *BAALC*; ОМЛ

Summary

Background. According to the WHO classification 2008 there are some genetic abnormalities - $t(8;21)$, $inv(16)$, $t(15;17)$, etc, typical for AML. Mutations in the *NPM1*, *CEBPA* and *FLT3* genes, named as «provisional entity», were proposed for the diagnostics of cytogenetically negative AML. Aim: investigation of *FLT3* mutation status and *CEBPA* and *BAALC* genes expression status as additional prognostic factors in AML. Methods. In the study was analyzed 92 AML, 30 acute lymphoblastic leukemia (ALL) primary patients and 32 healthy donors. A diagnosis of AML was verified by using the method of multicolor flow cytometry, morphology, cytochemistry. Genetic studies included: mutation of *FLT3-ITD*, *FLT3-D835Y* and *CEBPA* and *BAALC* expression analysis. Results. Mutations of *FLT3-ITD* and *FLT3-D835Y* were detected in 16% and 7% of AML cases, respectively. The *BAALC* mRNA level in AML patients was at 2 logs higher than in the control group, however, the mRNA level of *CEBPA* gene in AML patients was at 2 logs lower than the control group. Expression status of these genes in ALL patients was not significance. Conclusions. Assessment of *CEBPA* and *BAALC* expression profile seems to provide an additional diagnostics marker in cases of cytogenetically normal AML patients. Prognostic significance of these markers should be confirmed in further studies.

Key words: *FLT3* mutations; *CEBPA*; *BAALC* expression; AML

Введение

Острый миелобластный лейкоз (ОМЛ) возникает в результате накопления приобретенных генетических нарушений, появившихся в предшественниках гемопоэтических клеток и нарушающих их рост, дифференцировку и пролиферацию.

Ответственный за ведение переписки -
Зарайский Михаил Игоревич;
Тел.: 8(904)334-37-54
e-mail: mzaraiski@yandex.ru

Встречаемость острых лейкозов составляет менее 3% среди всех злокачественных новообразований, однако, ОМЛ продолжает лидировать по числу смертей из-за детской смертности и смертности пациентов старше 39 лет и составляет около 25% случаев всех лейкозов среди взрослых. В мире заболеваемость ОМЛ составляет 2,5-4,3 случая на 100 000 населения в год и наиболее высока в Австралии, Западной Европе и США. Средний возраст при диагностировании составляет 65 лет с небольшим преобладанием мужчин в большинстве случаев. У детей до 15 лет ОМЛ составляет 15-20% всех случаев острых лейкозов с пиком возникновения в первые 3-4 года жизни. Смертность значительно зависит от возраста и составляет от 2,7 до 18 случаев на 100 000 человек в год [1].

В диагностике и лечении лейкозов важное значение имеет карิโอтип лейкозных клеток, а именно наличие таких генетических перестроек как: $t(8;21)(q22;q22)$, $inv(16)(p13.1;q22)$, $t(16;16)(p13.1;q22)$ или $t(15;17)(q22;q12)$ [1, 2].

Тем не менее, примерно у половины пациентов с ОМЛ не удается выявить клональных хромосомных перестроек. Все подобные случаи ОМЛ с нормальным карิโอтипом в настоящее время относят к группе умеренного риска, однако отмечено, что проявления заболевания у пациентов в этой группе достаточно гетерогенны, в том числе и по уровню 5-летней выживаемости, которая варьирует от 24 до 42% [3, 4]. Показано, что гетерогенность ОМЛ на молекулярно-генетическом уровне, во многом определяет клинический прогноз течения заболевания [5].

Согласно действующей классификации, при диагностике ОМЛ используются данные морфологического анализа, иммунофенотипирования, а так же определенные генетические особенности. Подтверждена диагностическая и прогностическая значимость мутаций генов JAK2, MPL, KIT, NPM1, CEBPA, FLT3 и других генов [1].

В настоящее время идентифицировано более 700 балансовых перестроек, ассоциированных с ОМЛ. Частоты четырех наиболее частых транслокаций колеблются от 3 до 10%. К ним относятся транслокации $t(15;17)(q22;q12)/PML-RARA$, $t(8;21)(q22;q22)/RUNX1-RUNX1T1$, инверсия $inv(16)(p13q22)/CBFB-MYH11$ и $11q23/MLL$ [6].

Генетические нарушения, лежащие в основе ОМЛ, не ограничены хромосомными мутациями. За последние несколько лет описан ряд приобретенных мутаций соматических генов: нуклеофосмина 1 (NPM1), FLT3, CEBPA, MLL, вирусной нейробластомы RAS, гена опухоли Вилмса WT1, а так же нарушения в экспрессии некоторых генов, ассоциированных с развитием ОМЛ [7, 8].

Мутации в генах FLT3 и CEBPA признаны ВОЗ диагностически значимыми [1]. Определение мутационного статуса указанных генов рекомендовано ВОЗ для диагностики и прогноза течения ОМЛ. Так же оценена роль повышенной или пониженной экспрессии генов, которая может послужить диагностической и прогностической моделью в будущем [1]. В частности, показана прогностическая значимость уровня экспрессии гена BAALC у пациентов с ОМЛ [9].

Генетические нарушения, возникающие при ОМЛ, носят комплексный характер, поэтому нами была предпринята попытка оценить различные параметры, потенциально применимые в целях диагностики.

Материалы и методы

Исследуемую группу составили 92 пациента с подтвержденным диагнозом «острый миелобластный лейкоз», группу сравнения составили 30 пациентов с верифицированным диагнозом «острый лимфобластный лейкоз». Все пациенты находились под наблюдением в Санкт-Петербургском Государственном Медицинском Университете им. акад. И. П. Павлова в период с февраля 2009 года по апрель 2010 года. В качестве отрицательного контроля были использованы образцы крови 32 доноров.

Верификацию диагноза проводили методом проточной цитофлуориметрии по критериям, принятым ВОЗ [10].

Средний возраст пациентов с диагнозом ОМЛ составил 52 года (от 23 до 73 лет), возраст пациентов с диагнозом ОЛЛ — 19 лет (от 3 до 33 лет).

Образцы крови и пунктата костного мозга подвергали отмывке для выделения фракции лейкоцитов. Обработка проводилась с использованием буфера для лизиса эритроцитов (ДНК-Технология, Россия) согласно инструкции производителя.

Выделение геномной ДНК проводилось с использованием набора «Проба-НК» (производство ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), согласно инструкции производителя.

Тотальная РНК выделялась фенол-хлороформным методом, с помощью набора «Рибо-золь-А» (Интерлабсервис, Россия), согласно прилагаемой инструкции.

Приготовление кДНК проводили с помощью реакции обратной транскрипции (набор «Реверта-Л-100», Интерлабсервис, Россия).

Определение мутационного статуса гена FLT3 проводили при помощи амплификации по стандартной двух-праймерной схеме в конечном объеме 10 мкл на амплификаторе ДТ-96 (ДНК-Технология, Россия). Реакционная смесь содержала: 2 μ л ДНК, 14 μ Мол каждого праймера, смесь dNTP в конечной концентрации 0,2 mM и 2,5 единиц термостабильной Taq-полимеразы (Helicon, Москва) в стандартном буфере (Амплисенс, Москва) с содержанием Mg^{2+} 15 mM. Типовая программа амплификации состояла из начальной денатурации (96°C, 3 мин), 35 циклов, включавших денатурацию (96°C, 30 с), отжиг праймеров (60°C для ITD и 58°C для D835Y, 30 с), элонгацию (72°C, 40 с), и заключительной элонгации (72°C, 5 мин). Последовательности используемых праймеров представлены в таблице 1.

При исследовании внутренних тандемных дупликаций (ITD) гена FLT3 продукт амплификации без предварительной обработки вносили в стандартный 8% полиакриламидный гель в камере для вертикального фореза: «SE-2» (Хеликон, Москва). Электрофорез проводили в буфере TBE при напряженности электрического поля 10 В/см в течение 2 часов. После проведения электрофо-

Таблица 1. Праймеры, используемые в работе

Название гена\мутации	Последовательность	Температура отжига, °C
ВТД (ITD) в гене FLT3	F 5'-TCTGCAGAACTGCCTATTCT-3' R 5'-CTTTCAGCATTTTGACGGCAA-3'	60
Замена D835Y в гене FLT3	F 5' CCGCCAGGAACGTGCTTG 3' R 5' GCAGCCTCACATTGCCCC 3'	58
BAALC	F 5'-AGCCGCCGCCAGAGCCGACAG-3' R 5'-GGGATCCAGTGCCGTGAAGG-3'	61
СЕВРА	F 5'-CTTCAACGACGAGTTCCTGGCCGA-3' R 5'-AGCTGCTTGGCTTCATCCTCT-3'	64
GAPDH	F 5'-TGGAATCCCATCACCATCT-3' R 5'-GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3'	65
АСТВ	F 5'-CTC TTC CAG CCT TCC TTC CT-3' R 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'	61
B2M	F 5'-TACATGTCTCGATCCCACTTAACATAT-3' R 5'-AGCGTACTCCAAGATTCAAGTT-3'	61

реза гель окрашивали в растворе бромистого этидия (0,5 мкг/мл) в буфере ТВЕ. Визуализацию и фотографирование результата электрофореза проводили в ультрафиолетовом свете (длина волны 312 нм) свете на трансиллюминаторе (Vilber Lourmat, Франция).

Для определения однонуклеотидной замены D835Y гена FLT3 использовали метод рестрикции. К продукту амплификации без предварительной подготовки добавляли рестриктазу EcoRV (New England Biolabs) в количестве 10 U на пробу. Рестриксию проводили при температуре 37°C в течение 16 часов. Продукт рестрикции вносили в 8% полиакриламидный гель, электрофорез проводили описанным выше способом.

Оценку уровня экспрессии генов СЕВРА и BAALC проводили методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Реакция проводилась в объеме 15 мкл. Реакционная смесь содержала 1-кратный буфер с флуоресцентным красителем SYBR-green (Синтол), 1-кратный раствор Mg²⁺ (Fermentas), 0,2mM dNTP, праймеры в конечной концентрации 15pM, 1 ед. Hot-Rescue Taq-полимеразы (Синтол). В качестве матрицы использовалась геномная ДНК (3мкл).

Амплификацию гена BAALC проводили в 45 циклов при следующих условиях: первичная денатурация при 95°C в течение 5 мин, денатурация ДНК при 95°C 30 сек, отжиг праймеров и элонгация при 62° 40 сек, заключительный этап элонгации 72° 10 мин. Далее для определения специфичности продукта проводили анализ кривой плавления со снижением температуры на шаг 0,5°C за 15" до температуры 55°C.

Амплификацию гена СЕВРА проводили по аналогичной методике, с применением функции градиента температуры отжига: от 64°C для СЕВРА и до 61°C для

референсного гена B2M.

Относительный уровень экспрессии генов BAALC и СЕВРА определяли по алгоритму двойного нормирования [11]. Для каждого гена (в том числе и референсного) в качестве единичного принимались значения Ct (threshold cycle, цикл пересечения порога детекции) одного из образцов контрольной группы. Относительно этого значения нормировались показатели всех остальных образцов контрольной группы, группы сравнения (пациенты с ОМЛ) и экспериментальной группы (пациенты с ОМЛ) по формуле: 2^{xk-xi} , где xk — значение Ct образца, принятое за единичное, xi — значение Ct каждого другого исследованного образца. Далее для каждого образца вычисляли отношение нормированного значения гена интереса к нормированному значению референсного гена (IR). Для каждой группы образцов (контроль, группа сравнения, опытная группа) вычисляли среднее арифметическое значение и стандартную ошибку. Достоверность полученных результатов проверяли с помощью стандартного статистического пакета – «Статистика 5.0».

Результаты и обсуждение

Определение мутационного статуса гена FLT3

56 пациентов были обследованы на наличие внутренней тандемной дупликации и замены D835Y в гене FLT3. Внутренняя тандемная дупликация была обнаружена у 9 пациентов (16%), замена D835Y — у 4 пациентов (7%). Ни у одного из пациентов не было выявлено присутствия обеих мутаций (Рисунок 1). Встречаемость мутаций гена FLT3 у пациентов с различными типами ОМЛ представлено в таблице 2.

Встречаемость замены D835Y и внутренней тандемной дупликации в гене FLT3 согласуются с литературными данными [12, 13].

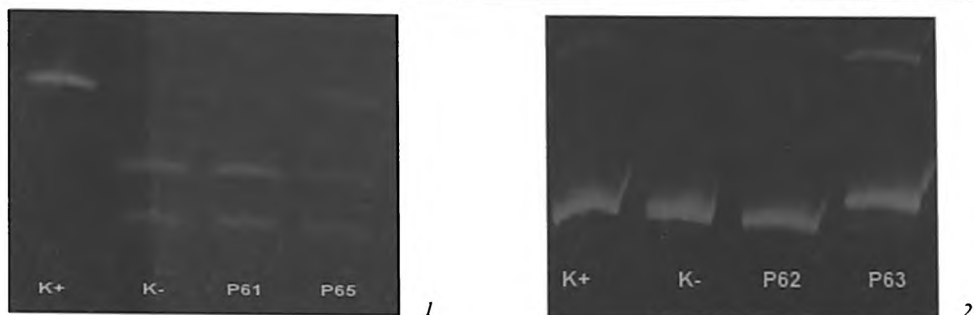


Рис.1. Электрофореграмма ПЦР исследования по выявлению различных типов мутации гена FLT3
 1. *Определение замены D835Y (K+ положительный контроль; K- отрицательный контроль; P61 — проба без мутации; P65 — проба с мутацией, гетерозигота);* 2. *Определение внутренней тандемной дупликации (K+ положительный контроль; K- отрицательный контроль; P62 — проба без мутации; P63 — проба с дупликацией).*

Таблица 2. Распределение мутаций в соответствии с подтипом ОМЛ

Подтип ОМЛ	Всего обследованных пациентов	Положительный результат на FLT3-ITD	Положительный результат FLT3 D835Y
M?	8	0	0
M0	2	1	0
M1	6	0	0
M0-M1	1	1	0
M1-M2	5	0	0
M2	15	3	2
M3	4	2	1
M4	12	2	1
M5	2	0	0
M7	1	0	0
Всего	56	9	4

Оценка уровня экспрессии генов BAALC и СЕВРА

Для оценки относительного уровня экспрессии гена BAALC были исследованы 80 пациентов с диагнозом ОМЛ, 22 пациента с диагнозом ОЛЛ и 32 донора, относительный уровень экспрессии гена СЕВРА исследовали в группе из 71 пациента с установленным диагнозом ОМЛ, 26 пациентов с диагнозом ОЛЛ и у 32 доноров.

Исходными данными для оценки достоверности различий относительных уровней экспрессии исследуемых генов служили значения цикла амплификации (Ct), при которых амплификатор фиксировал пороговые уровни накопления интеркалирующего красителя в пробе.

В каждой исследуемой группе определяли среднее арифметическое (M) значение для относительного уровня экспрессии гена интереса (1/R) и стандартную ошибку среднего (SEM). Достоверность различий уровня экспрессии каждого гена в каждой паре исследуемых групп

определяли с помощью Т-критерия Стьюдента (для $p < 0,05$), (Таблица 3).

Уровень экспрессии гена СЕВРА в группе ОМЛ оказался выше почти в 2 раза, чем в группе доноров. У пациентов с ОЛЛ относительный уровень экспрессии исследуемого гена оказался незначительно понижен относительно такового у доноров. Выявленные различия показывают почти трёхкратное превышение уровня экспрессии гена СЕВРА у пациентов с ОМЛ по сравнению с группой пациентов с ОЛЛ. Однако при проверке достоверности обнаруженных различий с помощью Т-критерия Стьюдента было установлено, что они не могут считаться достоверными ($t_{\text{эмп}} < t_{\text{кр}}; p < 0,05$).

В группе пациентов с ОМЛ экспрессия гена BAALC оказалась снижена относительно уровня экспрессии у доноров на два порядка. Выявленные различия можно считать достоверными на основании сравнения эмпирического значения Т-критерия с критическим ($t_{\text{эмп}} > t_{\text{кр}}; p < 0,05$).

Таблица 3. Относительный уровень экспрессии генов

	BAALC				CEBPA			
	разброс	M	SEM	T-кр	разброс	M	SEM	T-кр
Доноры	(1; 3821,7)	241,60	121,46		(0,0006; 22,63)	0,98	0,70	
ОЛЛ	(0,01; 30573,63)	3180,42	1858,72	н/д	(0,0022; 5,28)	0,67	0,29	н/д
ОМЛ	(0,0002; 90,51)	6,86	1,63	(P<0,05)*	(0,0024; 68,59)	1,87	1,01	н/д

Выводы

Таким образом, выявленные различия в уровне экспрессии гена CEBPA между здоровыми людьми и исследуемыми группами не являются достоверными. Отличия, уровня экспрессии гена BAALC, являются достоверными только в общей группе пациентов с ОМЛ.

Расширение представлений о достоверном отличии уровней экспрессии между пациентами с ОМЛ и донорами позволит в дальнейшем получить дополнительный молекулярно-генетический критерий диагностики ОМЛ у пациентов с нормальным кариотипом и проводить оценку прогноза течения заболевания.■

Литература:

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. - Lyon, France: IARC Press, 2008.
2. Л.А. Антипова, С.С. Лория, С.В. Семочкин, А.Г. Румянцев Результаты лечения острого миелоидного лейкоза у детей группы неблагоприятного прогноза по протоколу ОМЛ-ММ-2000 // Гематология. - №1. - P. 5-14.
3. Motyckova G., Stone R.M. The role of molecular tests in acute myelogenous leukemia treatment decisions // Current Hematologic Malignancy Reports. - 2010. - №5(2). - P. 109-17
4. Schlenk RF, Dühner K. Impact of new prognostic markers in treatment decisions in acute myeloid leukemia // Current Opinion Hematology. - 2009. - №16(2). P. 98-104.
5. Mryzek K, Radmacher MD, Bloomfield CD, Marcucci G. Molecular signatures in acute myeloid leukemia // Current Opinion in Hematology. - 2009. - № 2. - P. 64-9
6. Martens JH, Stunnenberg HG. The molecular signature of oncofusion proteins in acute myeloid leukemia // Febs Letters. - 2010. - №584(12). - P. 2662-9.
7. Dühner K, Dühner H. Molecular characterization of acute myeloid leukemia // Haematologica. - 2008. - №93(7). P. 976-82.
8. Л.В. Гук, Т.В. Савицкая, Д.А. Домнинский, В.О. Бобрынина, М.М. Шнейдер, А.А. Масчан, О.В. Алейникова Анализ частоты и прогностического значения мутаций генов FLT3, c-KIT и NPM1 у детей с острым миелобластным лейкозом // Гематология. - 2009. - №9. - P. 27-32.
9. Tanner S.M., Austin J.L., Leone G., Rush L.J., Plass C., Heinonen K., Mrozek K., Sill H., Knuutila S., Kolitz J.E., Archer K.J., Caligiuri M.A., Bloomfield C.D., de la Chapelle A. BAALC, the human member of a novel mammalian neuroectoderm gene lineage, is implicated in hematopoiesis and acute leukemia // Proceedings of the National Academy of Science of the USA. -2001. - № 98. - P. 13901-13906.
10. Vardiman J.W., Thiele J., Arber D.A., Brunning R.D., Borowitz M.J., Porwit A., Lee H.N., Le Beau M.M., Lindberg E.H., Tefferi A., Bloomfield C.D. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes // Blood. - 2009. - № 5(114). - P. 937-51.
11. Mogilenko D.A., Dizhe E.B., Shavva V.S., Lapikov I.A., Orlov S.V., Perevozchikov A.P. Role of the nuclear receptors HNF4 alpha, PPAR alpha, and LXRs in the TNF alpha-mediated inhibition of human apolipoprotein A-I gene expression in HepG2 cells // Biochemistry. - 2009. - № 48(50). -P. 11950-60.
12. Abu-Duhier F.M., Goodeve A.C., Wilson G.A. Identification of novel FLT3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia // British Journal of Haematology. - 2001. - № 113(4). - P. 983-988.
13. Rombouts WJ, Blokland I, Lütwenberg B, Ploemacher R.E. Biological characteristics and prognosis of adult acute myeloid leukemia with internal tandem duplications in the Flt3 gene // Leukemia. - 2000. - № 14(4). - P. 675-83.