

Виноградов А.В.¹, Литвинова Д.В.², Резайкин А.В.²,
Сазонов С.В.², Сергеев А.Г.²

УДК 616.155.02-006
DOI 10.25694/URMJ.2020.02.04

Детекция точечных мутаций в гене ASXL1 при гемобластозах методом прямого автоматического секвенирования

¹ ГБУЗ СО «Свердловская областная клиническая больница №1», Министерство здравоохранения Свердловской области, г. Екатеринбург. ² ФГБОУ «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, г. Екатеринбург

Vinogradov A.V., Litvinova D.V., Rezaikin A.V., Sazonov S.V., Sergeev A.G.

Detection of ASXL1 gene point mutations in blood malignancies using direct automatic sequencing

Резюме

Цель исследования - определить частоту точечных мутаций гена ASXL1 при гемобластозах методом прямого автоматического секвенирования. Материалы и методы. Исследовали пробы костного мозга и периферической крови 26 больных гемобластозами в возрасте от 18 до 68 лет, проходивших лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре в период с 2012 по 2018 г., из них с морфологическим вариантом ОМЛ M0 – 3, M1 – 1, M2 – 10, M3 – 2, M4 – 3, M5 – 1, M6 – 1, M7 – 1, бластная плазмацитоидная дендритоклеточная опухоль – 1, острый гибридный лейкоз – 1, ХММЛ – 1, бластный криз ХМПЗ – 1. Выделение тотальной РНК из лейкозных клеток проводили методом сорбции на силикагелевом носителе с последующим связыванием РНК из раствора с мембраной в минисцентрифужной колонке с последующей обратной транскрипцией. Участки кДНК, соответствующие экзонам 12-13 гена амплифицировали методом ПЦР. Детекцию мутаций гена ASXL1 проводили методом прямого автоматического секвенирования с использованием генетического анализатора ABI Prism 310. Результаты. Установлено, что функционально значимые точечные мутации гена ASXL1 обнаруживались в 19,2% проб при ОМЛ M0, M2, M4 и остром гибридном лейкозе (ОМЛ/ОЛЛ BII), в 4 случаях были представлены делецией n. Del (1755;2007), в одном – дупликацией dup1934G. Наряду с мутациями гена ASXL1 в указанных образцах определялись точечные мутации генов NRAS, FLT3, TP53, комплексные, количественные хромосомные aberrации, а также транслокация t(9;22)(q34;q11). Во всех наблюдениях ОМЛ с мутациями гена ASXL1 ассоциировались с низкой эффективностью стандартной программной полихимиотерапии и неблагоприятным прогнозом заболевания. Ключевые слова: точечная мутация, острый миелоидный лейкоз, ген ASXL1, прямое секвенирование

Summary

The aim was to determine the frequency of point mutations of the ASXL1 gene in blood malignancies using direct automatic sequencing. Materials and methods. Bone marrow and peripheral blood samples of 26 patients with blood malignancies aged from 18 to 68 years, treated at the Sverdlovsk regional hematological center in the period from 2012 to 2018, were examined, including those with a morphological variant of AML M0 – 3, M1 – 1, M2 – 10, M3 – 2, M4 – 3, M5 – 1, M6 – 1, M7 – 1, blast plasmacytoid dendritic cell neoplasm – 1, acute hybrid leukemia – 1, CMML – 1, chronic myeloproliferative disease (blast crisis) – 1. Isolation of total RNA from leukemia cells was realized using sorption on a silica gel carrier followed by binding of RNA from a solution with a membrane in a minicentrifuge column followed by reverse transcription. cDNA regions corresponding to exons 12-13 of the ASXL1 gene were amplified by PCR. ASXL1 gene mutations were detected by direct automatic sequencing using ABI Prism 310 genetic analyzer. Results. It was found that functionally significant point mutations of the ASXL1 gene were detected in 19.2% of samples in AML M0, M2, M4 and acute hybrid leukemia (AML/ALL BII), in 4 cases were represented by deletion n. Del (1755;2007), in one – by duplication dup1934G. In addition, point mutations of NRAS, FLT3, TP53 genes, complex, quantitative chromosomal aberrations, as well as translocation t(9;22)(q34;q11) were determined in these samples. In all cases, AML with ASXL1 gene mutations were associated with low efficiency of standard program chemotherapy and unfavorable prognosis.

Key words: point mutation, acute myeloid leukemia, ASXL1 gene, direct sequencing

Таблица. Последовательности праймеров для амплификации и секвенирования экзонов 12-13 гена ASXL1

Название	Последовательность	Область применения
ASXL-F	5' CCG GCT TGA AGA TCG TCA 3'	Амплификация экзонов 12 – 13
ASXL-R	5' GAC CCT CCT CAG CTG TCA AAT C 3'	
ASXL-S1	5' ACA CCG AAA AGC CAC AGC 3'	Секвенирование
ASXL-S2	5' ATG GTG GTG AGG CCT GTG 3'	
ASXL-S3	5' GAG GGG TGG GAG CAG CTT 3'	

Введение

Ген ASXL1 локализуется в первом сегменте первого региона длинного плеча хромосомы 20 и кодирует белок asxl1, участвующий в эпигенетической регуляции экспрессии генов и процессе ремоделирования хроматина. Указанный механизм является комплексным и динамичным, включает взаимодействие между факторами транскрипции, некодирующими РНК, ДНК и гистон-модифицирующими ферментами [1-3].

Мутации гена ASXL1 сопровождаются значительным риском возникновения злокачественных миелоидных новообразований и чаще всего определяются при миелодиспластическом синдроме (МДС), остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) и хроническом миеломоноцитарном лейкозе (ХММЛ). По данным некоторых зарубежных исследований установлено, что при МДС мутации в гене ASXL1 определяются в 22,7% случаев, при ОМЛ – около 20,0%, при ХММЛ – 43,0%. При этом наиболее часто в мутагенез вовлекается экзон 12, кодирующий белковую последовательность, которая отвечает за регуляцию экспрессии генов, ответственных за такие процессы как рост и дифференцировка [1-3].

Однако, несмотря на то, что мутации ASXL1 оказались достаточно широко распространенными при МДС, ХММЛ и ОМЛ, их выявление не нашло широкого применения в клинической онкогематологии из-за отсутствия сертифицированных тест-систем и технологий детекции.

Цель работы – определить частоту точечных мутаций в гене ASXL1 при злокачественных новообразованиях системы крови методом прямого автоматического секвенирования.

Материалы и методы

Исследовали пробы костного мозга и периферической крови 26 больных гемобластозами в возрасте от 18 до 68 лет, проходивших лечение в Свердловском областном онкогематологическом центре в период с 2012 по 2018 г. Среди них с морфологическим вариантом ОМЛ М0 по классификации ВОЗ [4,5] наблюдалось трое пациентов, М1 – 1, М2 – 10, М3 – 2, М4 – 3, М5 – 1, М6 – 1, М7 – 1, бластная плазмацитоидная дендритоклеточная опухоль – 1, острый гибридный лейкоз (ОМЛ/ОЛЛ ВП) – 1, хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ 2) – 1, хроническое миелопролиферативное заболевание (ХМПЗ, бластный криз эссенциальной тромбоцитемии) – 1. Диагноз устанавливался на основе клинической картины, цитологического и цитохимического исследования аспирата костного мозга, при необходимости дополнительно осуществлялось гистологическое и иммуногистохимическое исследование трепанобиоптата подвздошной кости [6].

В исследуемой группе всем пациентам выполнено цитогенетическое (G-banding) и/или молекулярно-генетическое (полимеразная цепная реакция в реальном времени, ПЦР-РВ) исследование. Методом прямого автоматического секвенирования исследованы на наличие молекулярных повреждений экзоны 12-13 гена ASXL1 (таблица). Кроме того, в 24 образцах методом прямого автоматического секвенирования исследованы на наличие мутаций экзоны 12-15, 19-21 гена FLT3, в 23 – экзоны 1-4 гена NRAS, в 22 – экзоны 7-12, 16-19 гена KIT и экзоны 6-9 гена WT1, в 21 – экзоны 4-11 гена TP53 и экзоны 9-12 гена NPM1, в 20 – экзоны 18-26 гена DNMT3A, в 14 – экзоны 1-4 гена KRAS, в соответствии с ранее описанными методиками [7-9].

Выделение тотальной РНК из лейкозных клеток проводили методом сорбции на силикагелевом носителе с последующим связыванием РНК из раствора с мембраной (силикой) в миницентрифужной колонке с помощью комплекта реагентов "QIAamp RNA Blood Mini Kit" (QIAGEN, Германия). Реакцию обратной транскрипции с целью получения кДНК проводили с использованием ревертазы М-MLV и гексануклеотидных праймеров со случайной последовательностью нуклеотидов ("РЕВЕРТА-Л", ФГБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва). Целевые участки исследуемых генов клонировали методом ПЦР-РВ в виде одного фрагмента с помощью праймеров, разработанных на основе депонированных в GenBank (NCBI) нуклеотидных последовательностей (NM_015338, транскрипционный вариант 1 гена ASXL1). Анализ продуктов амплификации проводили методом электрофореза с последующей детекцией в ультрафиолетовом трансиллюминаторе.

Секвенирование кДНК проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 310 по прямой и обратной последовательностям, согласно рекомендациям производителя. Сопоставление сегментов, выравнивание и сравнение последовательностей нуклеотидов и аминокислот проводили с использованием компьютерной программы MEGA, версия 5.0.

Обработка результатов исследования проведена в предположении, что они могут быть описаны биномиальным распределением. Оценка параметров эмпирического распределения проведена с помощью компьютерной программы «Биомод» [10]. Проверка статистической гипотезы проведена на основе точного критерия Фишера. Доверительные интервалы (ДИ) определяли на основе оценки средней частоты с вероятностью 95%.

Результаты и обсуждение

Точечные мутации гена ASXL1 выявлены в 5 пробах (19,2%, при 95% ДИ от 8,5 до 37,9%) при ОМЛ М0,

M2, M4 и остром гибридном лейкозе (ОМЛ/ОЛЛ ВП). Они были представлены делецией п. Del (1755;2007) (n=4, 15,4%, при 95% ДИ от 6,2 до 33,5%) и дупликацией dup1934G (n=1, 3,9%, при 95% ДИ от 0,7 до 18,9%). Известно, что дупликация dup1934G является одной из самых частых мутаций в гене ASXL1 и сопровождается вставкой дополнительного гуанина в положение 1935 нуклеотидной последовательности (что соответствует позиции 645 последовательности белка). Данное изменение приводит к сдвигу рамки считывания и нарушению синтеза белка ASXL1. Как следствие, осуществляется гиперэкспрессия генов, регулирующих рост и дифференцировку клеток. В свою очередь, делеция нуклеотидов в положении с 1755 по 2007 (п. Del (1755;2007)), приводит не только к сдвигу рамки считывания, но и образованию преждевременного стоп-кодона с последующей потерей С-терминального гомеодомена. В этом случае полностью нарушается синтез белка и регуляция им других генов. Обе генетические аномалии локализовались в экзоне 12, который кодирует белковую последовательность, отвечающую за регуляцию экспрессии генов, ответственных за такие процессы как рост и дифференцировка [1,3]. В соответствии с этим, указанные мутации гена ASXL1 были ассоциированы с неблагоприятным прогнозом и резистентностью опухолевых клеток к стандартному химиотерапевтическому лечению.

Наряду с мутациями в гене ASXL1 в трех образцах определялись также молекулярные изменения в других исследованных генах. Так, при ОМЛ М4 с трисомией по хромосоме 8 и дупликацией dup1934G в гене ASXL1 определялась также внутренняя тандемная дупликация в гене FLT3 протяженностью 111 нуклеотидов, начиная с позиции 1843, что обуславливало вставку 37 аминокислотных остатков в кодируемом полипептиде, начиная с позиции 615. В пробах от больных ОМЛ М0 с кариотипом 46, XX, del(5)(q13), del(15)(q21) и М2базо с комплексными хромосомными абберациями (47, XY, +13[11]/ 47, XY, +mar(16)[3]/ 46, XY, del(5)(p1.3-1.5)[3]/ 46, XY[3]) наряду с делецией п. Del (1755;2007) в гене ASXL1 определялись также несинонимичные трансверсии с. 181 C>A и с. 182 A>C в гене NRAS, соответственно. В пробе от больного с острым гибридным лейкозом (ОМЛ/ОЛЛ ВП) наряду с делецией в гене ASXL1 цитогенетическим и ПЦР-методом определялась транслокация t(9;22)(q34;q11), а также синонимичная транзигция в гене TP53 с. 639 A>G. Аналогичные изменения в генах ASXL1 и TP53 выявлялись в случае ОМЛ М2 с неуточненным кариотипом. То есть в большинстве наблюдений, мутации

в гене ASXL1 комбинировались с другими генетическими аномалиями, ассоциированными с неблагоприятным прогнозом [1,3,5].

Таким образом, детекция точечных мутаций в экзонах 12-13 гена ASXL1 методом прямого автоматического секвенирования в образцах периферической крови и костного мозга позволяла в 19,2% уточнить стратификацию прогноза программного химиотерапевтического лечения при злокачественных новообразованиях системы крови.

Заключение

Средняя частота точечных мутаций, определявшихся в экзонах 12-13 гена ASXL1 методом прямого автоматического секвенирования, составляла 19,2%, в том числе подгруппах ОМЛ М2 – два случая, ОМЛ М0, М4 и острый гибридный лейкоз – по одному. При этом, наряду с мутациями экзона 12-13 гена ASXL1 в исследуемых образцах определялись также точечные мутации генов NRAS (2 наблюдения) и ITD FLT3 (один случай), что может свидетельствовать о возможности молекулярной кооперации их белковых продуктов в ходе злокачественной трансформации лейкоэмической клетки-предшественницы. Наличие мутаций в экзонах 12-13 гена ASXL1 ассоциировалось с низкой эффективностью стандартной программной полихимиотерапии и неблагоприятным прогнозом. ■

Виноградов Александр Владимирович, кандидат медицинских наук, главный терапевт Министерства здравоохранения Свердловской области, врач-гематолог. **Литвинова Дарья Вячеславовна**, клинический ординатор, ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России. **Резайкин Алексей Васильевич**, кандидат медицинских наук, доцент кафедры медицинской физики, информатики и математики ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России. **Сазонов Сергей Владимирович**, доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой гистологии, цитологии и эмбриологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России. **Сергеев Александр Григорьевич**, доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России. Автор, ответственный за переписку — Виноградов Александр Владимирович, e-mail: a.vinogradov@egov66.ru тел. (343)3120003*899

Литература:

1. Bravo G.M., Lee E., Merchan B. et al. Integrating genetics and epigenetics in myelodysplastic syndromes: advances in pathogenesis and disease evolution. *Br. J. Haematol.* 2014; 166(5): 646-659.
2. Carbuccia N., Troupin V., Gelsi-Boyer V. et al. Mutual exclusion of ASXL1 and NPM1 mutations in a series of acute myeloid leukemias. *Leukemia.* 2010; 24(2): 469-473.
3. Gelsi-Boyer V., Brecqueville M., Devillier R. et al. Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *J. Hematol. Oncol.* 2012; 5: 12.

4. Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016; 127(20): 2391-2405.
5. Vardiman J.W., Thiele J., Arber D.A. et al. The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009; 114(5): 937-951.
6. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Салахов Д.Р. и др. Сравнительный анализ результатов типирования молекулярных повреждений гена *NPM1* при острых миелоидных лейкозах с использованием прямого автоматического секвенирования и иммуногистохимического метода. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2013; 4: 124-127.
7. Виноградов А.В. Разработка технологии детекции мутаций генов *CDKN2A/ARF*, *FLT3*, *KIT*, *NPM1*, *NRAS*, *TET2*, *TP53*, *WT1* при острых миелоидных лейкозах. *Российский онкологический журнал*. 2013; 4: 34-35.
8. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г. Детекция точечных мутаций в гене *DNMT3A* при острых миелоидных лейкозах методом прямого автоматического секвенирования. *Бюллетень сибирской медицины*. 2015; 14(1): 18-23.
9. Виноградов А.В., Резайкин А.В., Сергеев А.Г. Детекция точечных мутаций генов *KRAS* и *NRAS* при острых миелоидных лейкозах с использованием технологии прямого автоматического секвенирования. *Вестник Башкирского университета*. 2014; 19(3): 845-847.
10. Виноградов А.В. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ «Биомод» № 2017661500, 12.08.2017, выдано Федеральной службой по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам.
11. Шишкина Е.С., Тараканова Ю.Л., Фокина Е.С. Клинический случай синдрома Гийена-Барре на фоне острого лимфобластного лейкоза. *Уральский медицинский журнал*. 2019. № 13 (181). С. 82-84.
12. Сабурова И.Ю., Горбунова А.В., Слободнюк К.Ю., Горчакова М.В., Зуева Е.Е., Чередниченко Д.В., Эмануэль В.Л., Зарайский М.И. Разработка методов оценки мутационного статуса гена *FLT3* и уровня экспрессии генов *CEBPA* и *BAALC*, включенных в патогенез острого миелобластного лейкоза. *Уральский медицинский журнал*. 2011. № 3 (81). С. 90-94.