

Тест-системы на основе метода ОТ-ПЦР для определения экспрессии химерных онкогенов при лейкозах

Аксенова Е.В.

Введение

Трансформация нормальной клетки в злокачественную обусловлена изменениями генома этой клетки. Преобразование протоонкогена в онкоген может быть следствием мутаций или цитогенетических аномалий. Хромосомные нарушения, происходящие в клетках больных различными видами гемобластозов, хорошо изучены. Известно несколько десятков хромосомных аномалий, характерных для определенных типов лейкозов, цитогенетический анализ давно стал обязательным компонентом диагностики. В последнее время стала известна и молекулярная основа многих из этих хромосомных изменений. Изучены гены, вовлеченные в специфические транслокации, делеции и инверсии: их структура, функции кодируемых ими белков в нормальных клетках и строение химерных онкогенов в клетках опухолей. Для части химерных генов выяснены возможные пути влияния их белковых продуктов на процессы транскрипции, пролиферации и апоптоза в злокачественных клетках. Существует несколько групп транслокаций, объединенных по функциям входящих в них генов. Одна из групп – это транслокации, включающие компоненты так называемого Core Binding Factor (CBF), играющего критическую роль в транскрипционной активации важных для гемопоэтического развития генов, таких как интерлейкин-3, ГМ-КСФ, рецептор М-КСФ, миелопероксидаза, энхансер рецептора Т клеток. К этой группе относятся транслокации t(8;21), t(3;21), t(12;21) и inv(16). Вторую группу составляют транслокации, связанные с рецептором ? ретиноевой кислоты (RAR?) – t(15;17), t(11;17), t(5;17). Третья большая группа хромосомных нарушений включает ген MLL, наиболее распространенными транслокациями являются t(4;11), t(9;11), t(11;19).

Определение и изучение хромосомных аномалий и экспрессии химерных онкогенов имеет несколько точек приложения. Часть хромосомных нарушений является характерными маркерами определенных типов и подтипов лейкозов и позволяет диагностировать эти заболевания. Например, транслокация t(9;22) обнаруживается практически в 100% случаев хронического миелолейкоза, t(15;17) присутствует у 95% больных острым промиелоцитарным лейкозом, инверсия 16 хромосомы характерна для острого миелобластного лейкоза типа М4 с эозинофилией (М4Е0). Наличие или отсутствие характерного молекулярного изменения служит для мониторинга минимальной остаточной болезни, позволяет отслеживать эффективность лечения, предсказывать рецидив заболевания. Определенные транслокации и другие хромосомные перестройки являются прогностическими факторами при острых лейкозах, соответственно их наличие может влиять на выбор и интенсивность лечения. Так, наличие t(9;22), t(4;11), t(1;19) при ОЛЛ имеет неблагоприятный прогноз, а обнаружение t(8;21), inv(16) при ОМЛ и t(12;21) при ОЛЛ является фактором благоприятного прогноза. Изучение функций белков, кодируемых aberrантными генами, путей их воздействия на клеточные процессы позволяет разрабатывать новые лекарственные средства направленного действия. Примерами таких лекарств являются ингибитор тирозинкиназной активности Гливек (Imatinib), применяемый при лечении ХМЛ, и полная трансретиноевая кислота (АТРА), использование которой позволило добиться существенного улучшения результатов лечения при ОПЛ. Цитогенетическое исследование является стандартным методом выявления хромосомных аномалий при лейкозах и широко используется для диагностики. Этот метод имеет ряд ограничений - обязательное наличие достаточного количества клеток в митозе, определение

только сравнительно крупных хромосомных нарушений. Существует более совершенный вариант цитогенетического анализа – флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), но и он имеет погрешность до 16%, обусловленную случайным наложением сигнала. Метод обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) позволяет определять экспрессию химерных онкогенов на молекулярном уровне, на уровне м-РНК. Метод ОТ-ПЦР имеет более высокую чувствительность, чем стандартный цитогенетический анализ – одна злокачественная клетка на 10⁴ -10⁶ здоровых, позволяет определять хромосомные микроперестройки, учитывать различные варианты транскриптов и сплайсинга при одной и той же транслокации.

Задачей нашей работы была разработка оригинальных тест-систем для определения методом ОТ-ПЦР экспрессии наиболее распространенных химерных онкогенов при ХМЛ, ОМЛ и ОЛЛ и применение их для диагностики и мониторинга лейкозов у пациентов ГНЦ РАМН и других гематологических клиник. Работа проводилась лабораторией генной инженерии ГНЦ РАМН совместно с ООО «ГеноТехнология» и клиническими отделениями ГНЦ: отделение химиотерапии лейкозов – руководитель д.м.н., проф. Хорошко Н.Д., отделение высокодозной химиотерапии и трансплантации костного мозга – руководитель чл.-корр. РАМН, д.м.н., проф. Савченко В.Г.

Материалы и методы

Для разработки тест-систем были выбраны 11 наиболее распространенных при лейкозах хромосомных нарушений, при этом учитывались наиболее часто встречающиеся варианты точек разрыва в слитых генах. Информация о генных последовательностях и структуре была получена в GeneBank, праймеры подбирались с использованием программ Vector NT и Blast. Были также подобраны праймеры и разработаны тест-системы для генов домашнего хозяйства – β -актина и глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (GAPDH). Для отладки тест-систем, диагностики и мониторинга использовались периферическая кровь и костный мозг пациентов ГНЦ РАМН, гематологических отделений РДКБ, института педиатрии, Морозовской детской клинической больницы, ГВКГ им. Бурденко, клинической больницы им. Боткина и других клиник.

Выделение тотальной РНК из клеток костного мозга и периферической крови проводилось по методу Chomczynski с использованием гуанидинтиоционата, фенола и хлороформа.

В реакции обратной транскрипции применяли обратную транскриптазу M-MLV и ингибитор РНКаз (Promega), гексамеры и специфические обратные праймеры, для каждой реакции использовалось 1-10мкг РНК.

Двухстадийная (nested) ПЦР проводилась на основе разработанных тест-систем «Онкоскрин» для определения экспрессии химерных онкогенов. Основными условиями, которым должна удовлетворять тест-система, были достаточно высокая чувствительность, специфичность и воспроизводимость результатов. Для каждой тест-системы подбирались оптимальные условия проведения ПЦР – состав реакционной смеси, температурные и временные параметры реакции, дальнейшая работа проводилась согласно предложенным в инструкции условиям.

В качестве положительных контролей использовались кДНК и ПЦР амплификаты, полученные от позитивных больных, кДНК клеток линии K562, фрагменты ДНК, клонированные в векторе pGEM-T в клетках E.coli. Детекция результатов осуществлялась путем электрофореза продуктов ПЦР в 6% полиакриламидном геле.

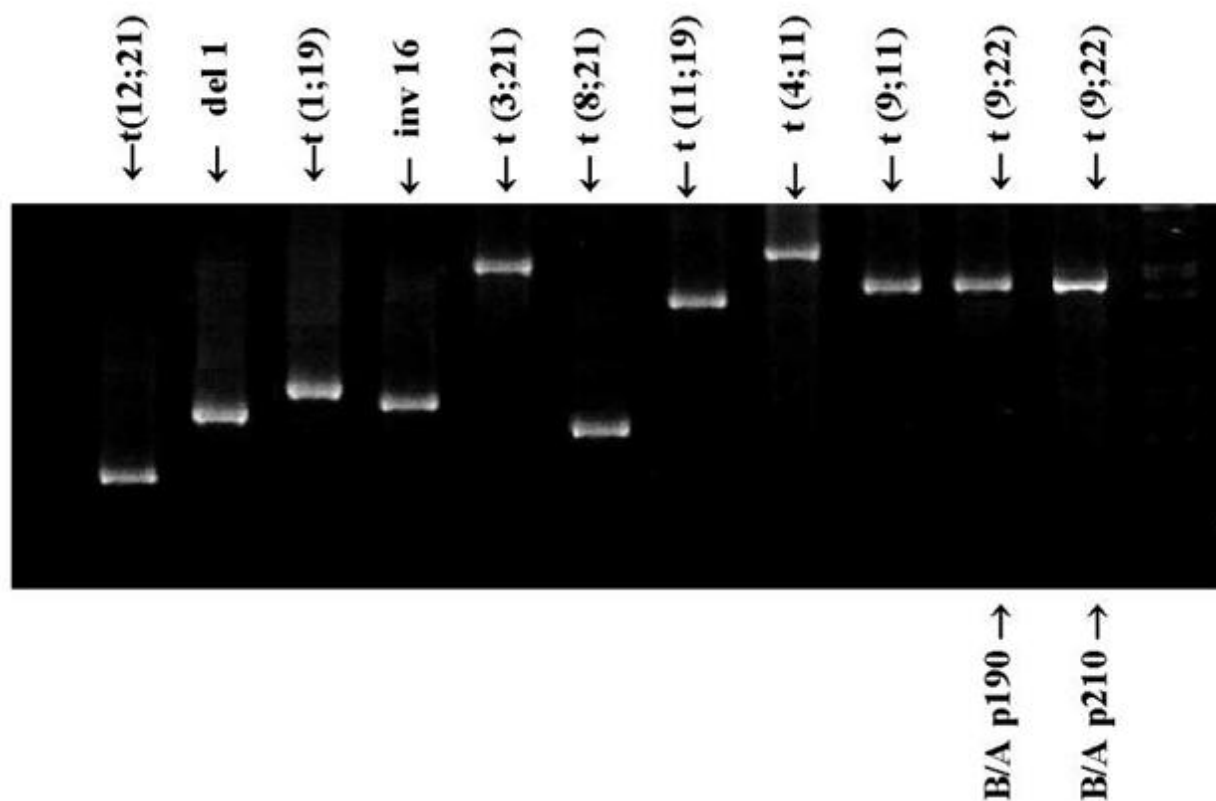


Рисунок 1. Результаты электрофоретического анализа продуктов ПЦР при определении различных хромосомных аномалий. 6%-полиакриламидный гель, окрашенный бромистым этидием.

Результаты

Нами были разработаны и успешно апробированы тест-системы на основе ОТ-ПЦР для определения экспрессии химерных онкогенов при гемобластозах. Созданы тест-системы для выявления наиболее распространенных хромосомных нарушений, характерных для различных типов лейкозов, при этом для каждой транслокации учитывались различные варианты точек разрыва и сплайсинга. Для $t(9;22)$ - химерного онкогена BCR-ABL созданы системы для определения вариантов b3a2 и b2a2 (p210), характерных для ХМЛ и ОЛЛ, и варианта e1a2 (p190), характерного для ОЛЛ. Проанализировано около 180 больных ХМЛ, 45 больных ОЛЛ, 40 больных ОМЛ (3-10 исследований на больного, срок наблюдения свыше 5 лет). Изучение экспрессии онкогена позволило осуществлять первичную диагностику ХМЛ, дифференцировать диагноз между ХМЛ, МДС, сублейкемическим миелозом и миелофиброзом, выявлять транслокацию у больных ОЛЛ и ОМЛ, контролировать состояние больных в процессе лечения, в том числе после пересадки костного мозга, изучать минимальную остаточную болезнь, предсказывать появление рецидивов. Для $t(15;17)$ - химерного онкогена PML-RARA тест-система с 3 парами праймеров позволяет определять наиболее часто встречающиеся при ОПЛ варианты транскрипта bcr1 и bcr3. Исследовано 7 детей и 189 взрослых, в среднем по 8-10 определений для каждого больного, срок наблюдения - 5 лет. Определение транскрипта позволило подтвердить диагноз ОПЛ, наблюдать за больными на всех этапах лечения, осуществлять диагностику молекулярного рецидива при сохранении у пациентов клинико-гематологической ремиссии. Кроме того, нами созданы тест-системы для определения транскрипции диагностически значимых химерных онкогенов при следующих хромосомных нарушениях: $t(8;21)$ - AML1-ETO, $t(4;11)$ - MLL-AF4, $t(9;11)$ - MLL-AF9, $t(11;19)$ - MLL-ENL, $t(1;19)$ - E2A-PBX1, $t(12;21)$ - TEL-AML1, del1 - SIL-TAL1, inv(16) - CBFB-MYH2, $t(3;21)$ - AML1-EV11. Эти хромосомные

изменения характерны для определенных типов лейкозов и возрастных групп, являются критерием благоприятного или неблагоприятного прогноза течения заболевания, наличие этих маркеров позволяет выбрать адекватную схему лечения. Частота встречаемости данных маркеров при гемобластозах различна (таблица 1). На наличие этих нарушений нами обследовано свыше 50 больных ОЛЛ и ОМЛ. В отличие от химерных онкогенов BCR-ABL и PML-RARA, анализ экспрессии которых стал в ГНЦ РАМН (Москва) неизменным компонентом диагностики, широкое применение анализа других онкогенов при различных хромосомных аномалиях в настоящее время только разворачивается. Таким образом, нами обследовано порядка 500 больных гемобластозами, проанализировано более 2000 образцов периферической крови и костного мозга, показана высокая эффективность разработанных тест-систем для диагностики и мониторинга лейкозов.

хромосомные нарушения	тип лейкоза	Частота встречаемости (%)	
		дети	взрослые
t(9;22) p210	ХМЛ	100	100
	ОЛЛ	2 - 10	20 - 50
t(9;22) p190	ХМЛ	единичные	единичные
	ОЛЛ	5	20 - 50
t(15;17)	ОПЛ (ОМЛ М3)	95	95
t(8;21)	ОМЛ М2	40	20 - 40
inv 16	ОМЛ	5 - 10	5 - 10
	ОМЛ М4	40 - 50	40 - 50
	ОМЛ М4Е0	100	100
t(9;11)	ОМЛ М5, М4	5 - 10	1 - 3
	ОМЛ М5а	до 25	
t(4;11)	ОЛЛ (В-ОЛЛ)	50 - 70 до 1 года 5	5
t(1;19)	ОЛЛ (пре-В-ОЛЛ)	5 - 6	1 - 3
t(12;21)	ОЛЛ (В-ОЛЛ)	25	< 2
del 1	ОЛЛ (Т-ОЛЛ)	5-25	16
t(3;21)	ХМЛ бл. криз, МДС ОМЛ	единичные	единичные
t(11;19)	ОЛЛ (В-ОЛЛ), МДС	единичные	единичные
	ОМЛ М4, М5	1 - 3	единичные