

## Молекулярная диагностика хронического миелолейкоза (ХМЛ)

А.В. Мисюрин

Специфическим маркером хронического миелолейкоза (ХМЛ) является филадельфийская хромосома (Ph<sup>+</sup>), которая возникает в результате реципрокной транслокации t(9;22) [1]. Почти во всех случаях ХМЛ разрыв 22-й хромосомы в гене BCR происходит в небольшом локусе M-bcr размером 5.8 т.п.н. Разрыв 9-й хромосомы может возникнуть в протяженной 5'-области гена ABL длиной свыше 300 т.п.н. [2]. При осуществлении транслокации t(9;22) в составе Ph<sup>+</sup>-хромосомы образуется химерный ген BCR/ABL, белковый продукт которого p210 BCR/ABL служит причиной развития хронического миелолейкоза [3,4].

Классический цитогенетический анализ, который в большинстве случаев позволяет достоверно устанавливать диагноз ХМЛ по присутствию в анализируемом образце Ph<sup>+</sup>-хромосомы, в условиях постоянного совершенствования терапии ХМЛ становится недостаточно чувствительным для оценки минимальной остаточной болезни. Затруднения при стандартном цитогенетическом анализе связаны еще и с тем, что около 5% ХМЛ даже в дебюте заболевания не имеют классической Ph<sup>+</sup>-хромосомы, которая изменяется до неузнаваемости в результате сложной генетической перестройки с участием дополнительных хромосом, однако химерный онкоген BCR/ABL у таких больных экспрессируется и может быть выявлен методами молекулярно-биологического анализа [5,6]. При этом Ph<sup>+</sup>-хромосома является генетической аномалией, наиболее полно проанализированной на молекулярном уровне, поэтому применение молекулярных методов для качественной и количественной диагностики этого маркера опирается на надежный теоретический фундамент.

В конце 80-х – начале 90-х годов минувшего века успех в лечении ХМЛ был связан с применением ТКМ и широким вовлечением в терапевтическую практику препаратов интерферона альфа [7,8]. Это позволило добиться у многих больных если не полной элиминации опухолевого клона, то значительного уменьшения количества опухолевых клеток в костном мозге и периферической крови. Именно в это время впервые стал острым вопрос о разработке высокочувствительных методов молекулярной диагностики ХМЛ, позволяющих выявлять единичные лейкозные клетки. В этот период для молекулярной диагностики ХМЛ стали применять метод блот-гибридизации по Саузерну [9]. Для использования в качестве зондов были клонированы специфические последовательности, комплементарные определенным участкам гена BCR области M-bcr, которая чаще всего при ХМЛ вовлечена в генетическую перестройку. Обычно использовали 2 зонда: 5'-зонд содержал экзон b1 области M-bcr с последовательностями примыкающих к этому экзону интронов, а 3'-зонд – большую часть третьего интрона M-bcr. Метод блот-гибридизации обладает более высокой чувствительностью в сравнении с цитогенетическим анализом, и в описываемый период он очень широко применялся во всем мире для молекулярной диагностики ХМЛ. Применение для блот-гибридизации пары разных зондов позволило разделить больных ХМЛ на 2 типа согласно вариантам геномных точек разрыва в области M-bcr: «5'» – когда точка разрыва оказывалась между экзонами b2 и b3 и «3'» – когда точка разрыва попадала между экзонами b3 и b4 или b4 и b5 (Рис.1). Применение метода блот-гибридизации для диагностики ХМЛ позволило изучить клинические особенности этого заболевания у пациентов, относящихся к 5' и 3' –типам точек разрыва. Ряд авторов утверждал, что при 3' варианте наблюдалась более короткая хроническая фаза ХМЛ, другие авторы не нашли никаких достоверных различий в продолжительности жизни и хронической фазы между этими вариантами транслокации t(9;22).

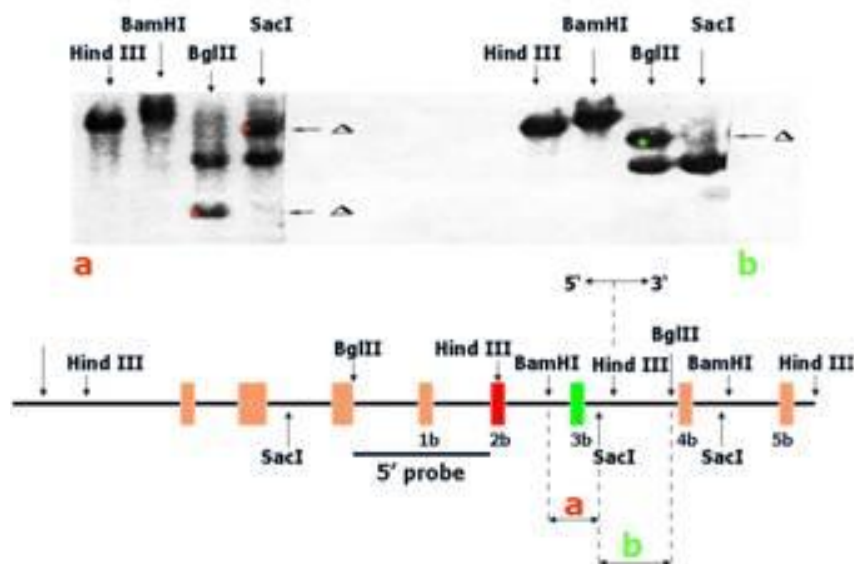


Рисунок 1. Анализ транслокации t(9;22) у больных хроническим миелолейкозом (a и b) методом блот-гибридизации по Саузерну. Фрагменты ДНК аномального размера указаны буквой "delta". В нижней части рисунка показана схема области M-bcr, на которой отмечены экзоны и интроны, сайты узнавания рестриктаз, расположение зонда и границы точек разрыва больных «5'» и «3'» типов.

Внедрение в начале 90-х метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) для молекулярной диагностики ХМЛ позволило более корректно разделить больных на группы, поскольку основным критерием для такого разделения стала не зона, в которую попадают геномные точки разрыва, а конечный результат молекулярной перестройки при t(9;22) – тип экспрессии химерного онкогена BCR/ABL [10]. При этом стали выявлять при ХМЛ основные варианты этого онкогена b2a2 и b3a2, а также e1a2. Вскоре во многом благодаря именно этой методике были обнаружены при ХМЛ и при Ph'-положительном ОЛЛ более редко встречающиеся транскрипционные варианты химерного онкогена BCR/ABL: e1a3, b2a3, b3a3, eба2, e19a2 [11]. Анализ интрон/экзонной структуры нормальных генов BCR и ABL позволяет выявить значительное число потенциальных соединений экзонов BCR с экзонами ABL с сохранением рамки считывания. Экзоны BCR e1, e6, e12(b1), e13(b2), e14(b3), e19(c3) и e20(c4) могут слиться «в рамку» с a2, a3 и a7 экзонами ABL (однако в месте слияния e12 и a7 должен возникнуть стоп-кодон). Некоторые из этих комбинаций действительно встречаются, а остальные теоретически возможны. Кроме того, экзоны BCR e2, e3, e4, e5, e7, e8, e10, e11, e15, e16, e17 и e22 могли бы слиться «в рамку» с экзонами ABL a4, a8, a9, a10 и a11; экзоны BCR e9 и e21 - с a5 и a6 ABL. Изучение искусственных мутантных форм BCR/ABL показало, что для проявления его трансформирующей активности необходим SH2 домен ABL, который закодирован в экзонах a3 и a4. Следовательно, маловероятно, что будут обнаружены в качестве единственного маркера Ph'-положительных заболеваний какие-либо варианты химерного гена BCR/ABL без этих экзонов.

Метод ПЦР для диагностики ХМЛ очень быстро завоевал всеобщее признание и вскоре вытеснил метод блот-гибридизации. Однако интерес к изучению геномных точек разрыва сохранялся, поскольку существовала надежда на то, что анализ их тонкой молекулярной структуры позволит вскрыть молекулярные механизмы, посредством которых осуществляется транслокация t(9;22). Для исследования геномных точек разрыва при ХМЛ применяли как создание и скрининг библиотек генов, так и более быстрые методы прогулок по хромосомам, в основе которых лежала и полимеразная цепная реакция. К сожалению, изучение рядом лабораторий первичной последовательности нескольких десятков разных геномных точек разрыва химерного онкогена BCR/ABL от больных ХМЛ пока не позволило выявить

никакой характерной молекулярной структуры, общей для всех проанализированных сайтов разрыва-слияния ДНК генов BCR и ABL. Высказано предположение, что варианты транслокации t(9;22), приводящие к появлению химерного онкогена BCR/ABL типов b3a2 и b3a3, могут осуществляться за счет гомологичной рекомбинации между Alu-повторами, которые расположены в первом интроне гена ABL, и повтором из того же семейства, лежащим в интроне между экзонами b3 и b4 области M-bcr [12]. Во втором интроне области M-bcr расположены сигналы, гомологичные сигналам, распознаваемым рекомбиназой V(D)J, отвечающей за реарранжировку иммуноглобулиновых генов и генов T-клеточных рецепторов. Пока не ясно, может ли незаконная активность рекомбиназного комплекса V(D)J быть ответственна за осуществление транслокации t(9;22), приводящей к появлению гена BCR/ABL типов b2a2 или b2a3. Установление структуры геномной точки разрыва гена BCR/ABL у конкретного больного ХМЛ позволяет разработать индивидуальную систему молекулярной диагностики, при помощи которой у этого больного на уровне геномной ДНК можно выявлять с высокой чувствительностью и специфичностью остаточные опухолевые клетки и проводить оценку их количества [13]. Однако самое широкое применение для молекулярной диагностики ХМЛ получила ПЦР-амплификация, субстратом которой является не геномная ДНК больного, а тотальная РНК, выделенная из клеток костного мозга или периферической крови. Метод, известный как ОТ ПЦР (обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция) достаточно прост и воспроизводим, позволяет выявлять различные транскрипционные варианты гена BCR/ABL и при этом он обладает такой высокой чувствительностью, что с его помощью можно обнаруживать одну опухолевую клетку среди 100000 – 1000000 анализируемых клеток. В середине 90-х годов этот метод был модифицирован таким образом, что появилась возможность не только выявлять ген BCR/ABL, но и оценивать интенсивность его экспрессии, а это равносильно определению опухолевой нагрузки при ХМЛ, что крайне важно для оценки эффективности лечения и мониторинга минимальной остаточной болезни. Модификация метода была осуществлена с использованием конкурентной ПЦР с титрованием матрицы [14].

Появление в арсенале гематологов ингибиторов тирозинкиназной активности, специфически подавляющих функцию химерного онкогена BCR/ABL, привело к настоящей революции в лечении ХМЛ и других Ph'-положительных заболеваний [15]. Необходимость в чувствительных и надежных методах количественной оценки остаточных опухолевых клеток стала еще более насущной. Стандартный цитогенетический анализ пополнился методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), чувствительность которого приблизилась к той, которая достижима при использовании ПЦР, а специфичность иногда оказывается даже выше, чем при ПЦР. Метод FISH сочетает в себе возможности и преимущества как молекулярно-биологического, так и визуального микроскопического анализа. Но ПЦР-анализ был также усовершенствован, и с появлением специального оборудования появилась возможность проводить так называемую ПЦР в реальном времени (Real Time PCR, RQ PCR). Появление ПЦР в реальном времени позволило превратить молекулярную диагностику ХМЛ из манипуляции, граничащей с искусством, в средство рутинного лабораторного анализа. При этом появилась возможность значительно упростить имеющиеся на сегодняшний день протоколы обследования больных ХМЛ в полной ремиссии. Кроме того, в рамках этого метода возникает возможность стандартизировать молекулярное лабораторное исследование, что позволяет сравнивать и унифицировать схемы лечения ХМЛ с применением ингибиторов тирозинкиназ во всем мире. При помощи ПЦР в реальном времени количество транскрипта гена BCR/ABL можно оценить как абсолютно, установив количество матрицы в анализируемом образце, так и по отношению к уровню экспрессии контрольного гена (GADPH, B2M, ABL, BCR, GUS) [16,17].

При лечении мезилатом иматиниба может развиваться резистентность к этому препарату, одной из причин которой является появление клонов опухолевых клеток, несущих мутации в участке гена BCR/ABL, определяющей тирозинкиназную активность. Таким образом, современные молекулярно-биологические исследования при ХМЛ позволяют следить за эволюцией опухолевого клона, контролируя уровень

экспрессии и оценивая мутационный статус химерного онкогена BCR/ABL. Данные молекулярной диагностики позволяют клиницисту адекватно оценивать эффективность лечения этого заболевания и в случае необходимости своевременно принимать меры для коррекции терапии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Rowley JD. The minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia.// *Science*. – 1960. – V.132. – P.1497.
2. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining.// *Nature*. – 1973. – V.243. – P. 290.
3. Groffen J., Strphenson JR., Heisterkamp N., de Klein A., Bartram CR., Grosveld G . Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22.// *Cell*. - 1984. – V.36, N.93. - P.93-99.
4. Daley G., Van Etten R., Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome.// *Science*. - 1990. – V.247 – P.824.
5. Daley G. Animal models of BCR/ABL-induced leukemias.// *Leukemia & Lymphoma*. 1993. v11 (suppl.1). pp57-60.
6. Melo J. The molecular biology of chronic myeloid leukaemia.// *Leukemia*. - 1996. – V.10. - P.751-758.
7. Wetzler M., Talpaz M., Estrov Z., Kurzrock R. CML: mechanisms of disease initiation and progression// *Leukemia & Lymphoma*. – 1993. – V.11 (suppl.1) – P. 47-50.
8. Melo J., Hochhaus A., Yan X., et al. Lack of correlation between ABL-BCR expression and response on interferon-alpha in chronic myeloid leukaemias.// *Br Jhaematol*. - 1996. – V.92. – P.684-686.
9. Katarjian HM., O'Brien S., Cortes JE., et al. Complete cytogenetic and molecular responses to interferon-alfa-based therapy for chronic myelogenous leukemia are associated with excellent long-term prognosis.// *Cancer*. – 2003. – V.2003 (2 suppl. 3). – 2003. – V.97. – P.1033-1041.
10. Mills K.I., Sproul A.M., Leibowitz D., Burnett A.K. Mapping of breakpoints, and relationship to BCR-ABL RNA expression, in Philadelphia-chromosome-positive chronic myeloid leukemia patients with a breakpoint around exon 14 (b3) of the BCR gene.//*Leukemia*. - 1991. - V.5. - P.937-941.
11. Roth MS., Antin JH., Ash R., et al. Prognostic significance of Ph<sup>+</sup>-positive cells detected by the PCR after allogeneic BMT for CML.// *Blood*. – 1992. – V.79. – P.276 – 82.
12. Saglio G., Guerrasio A., Rosso C., et all. New type of BCR/ABL junction in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia.// *Blood*. - 1990. – V.76. – P.1819.
13. Sowerby S.J., Kennedy M.A., Fitzgerald P.H., Morris C.M. DNA sequence analysis of the major breakpoint cluster region of the BCR gene rearranged in Philadelphia-positive human leukemias.// *Oncogene*. - 1993. – V.8. – P.1679-1683.
14. A.Misyurin, V.Surin, A.Tagiev. New breakpoints of t(9;22) translocation in chronic myeloid leukemia.// *Bioorg Khim*. - 1999. – V.25, N.3.- P.234-6.

15. Thompson JD., Brodsky I., and Yunis J. Molecular quantitation of residual disease in CML after BMT// Blood. – 1992.- V.79.-P.1629-35.
16. Cavdeville R., Buchdunger E., Zimmermann J., Matter A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. // Wat Rev Drug Discov. – 2002. –V.1. – P.493-502.
17. Gabert J., Beillard E., van der Velden VHJ., et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program.// Leukemia. – 2003. – V.17. – P.2318-2357.
18. Timothy Hughes, Susan Branford Molecular monitoring of BCR–ABL as a guide to clinical management in chronic myeloid leukaemia.// Blood Reviews. - 2006. – V.20, - P.29–41.