

Використання молекулярно-біологічних методів для виявлення філадельфійської хромосоми у хворих на лейкози

Г.Д.Телегеев*, М.В.Дибков, М.В.Божко, Н.М.Третяк¹, С.С.Малюта

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України
252143, Київ, вул. Академіка Заболотного, 150

¹Інститут гематології та переливання крові МОЗ України
252060, Київ, вул. М.Берлінського, 12

У роботі представлено результати досліджень з виявлення філадельфійської хромосоми у хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ) та гострий лімфобластний лейкоз (ГЛЛ). Застосовано два підходи: перший - з використанням 5' та 3' вср геномних зондів, що дозволяють виявляти патологічну хромосому у хворих на ХМЛ та деяких хворих на ГЛЛ; та другий - з використанням двоетапної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з специфічними для даних лейкозів праймерами. ПЛР метод є більш прийнятним для використання в клінічних умовах. Обговорюється питання етиології Ph' лейкозів.

Вступ. Розвиток злоякісних пухлин - це безконтрольний, необмежений ріст однієї, генетично-зміненої клітини (клона), що призводить до загибелі організму. Протікання даного процесу обумовлено порушенням балансу двох систем. У першій відбуваються структурні зміни нормальних генів (протоонкогенів) з утворенням нового гена (онкогена), експресія якого призводить до появи пухлинного фенотипу [1]. Звичайно для цього процесу залучаються гени, що визначають диференціацію, проліферацію або виживання клітин. У другій порушується функція генів, які за норми пригнічують пухлинний ріст (гени супресори пухлинного росту - антионкогени) [2].

На цитогенетичному рівні зміни генів визначають по наявності транслокацій, інверсій, делецій тощо. Першим цитогенетичним маркером пухлинного росту була маленька G-пофарбована хромосома, що отримала назву Ph (філадельфійською) хромосома [3]. Утворення згаданої хромосоми обумовлено реципрокною транслокацією між 9 та 22 хромосомами t(9;22) (q34;q11). Ця хромосома виявляється у 95% хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію, 25-30% дорослих та 2-10% дітей хворих на ГЛЛ [4-7]. На молекулярному рівні захворювання зумовлено утворенням злитого BCR/ABL гена (5' ділянка гена BCR поєднується з 3' ділянкою гена ABL). При ХМЛ продуктом трансляції є BCR/ABL білок з ММ 210 кДа (p210), що нараховує 927 чи 902 амінокислотних залишків гена BCR та 1097 а.з. гена ABL [8-10]. Химерні білки характеризуються зміненою тирозинкіназною активністю [11], що і визначає розвиток першого етапу ХМЛ. В той же час при ГЛЛ утворюється злитий білок з ММ 185 кДа (p185), що містить перші 426 амінокислот гена BCR та ті ж самі 1097 амінокислот гена ABL. Цей білок і призводить до розвитку клінічної картини ГЛЛ [12]. Наявність філадельфійської хромосоми значно погіршує прогноз у хворих на ГЛЛ. Так якщо п'ятирічне виживання дітей за відсутності даної транслокації складає 89%, то за її наявності даний показник складає 20%.

У даній роботі представлено результати апробації різних методів детекції Ph хромосоми: метод з застосуванням геномних зондів, що містять BCR ген та метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням специфічних наборів праймерів.

Матеріали та методи. В роботі використовували зразки крові хворих, що проходили лікування у гематологічних клініках м.Києва. ДНК з клітин білої крові виділяли за [13]. РНК отримували за [14]. Електрофорез ДНК, РНК, рестрикцію ДНК, перенесення ДНК на капронові фільтри, мічення зондів та гібридизацію проводили за [10,15].

У дослідженнях були використані наступні олігонуклеотидні праймери [5,10]:

A₁ 5' -ТГА.ТТА.ТАГ.ЦЦТ.ААГ.АЦЦ.ЦГГ.А -3'

A₂ 5' -ГГТ.ЦАТ.ТТТ.ЦАЦ.ТГГ.ГТЦ.ЦАГ.Ц -3'

A₃ 5' -ТЦА.ГАЦ.ЦЦТ.ГАГ.ГЦТ.ЦАА.АГТ.Ц -3'

які комплементарні послідовностям 2-го екзона *ABL* гена і необхідні для отримання кДНК та служать 3' праймерами в полімеразній ланцюговій реакції;

B₁ 5' -ГАА.ГТГ.ТТТ.ЦАГ.ААГ.ЦТТ.ЦТЦ.Ц -3'

B₂ 5' -ГГА.ГЦТ.ГЦА.ГАТ.ГЦТ.ГАЦ.ЦАА.Ц -3',

які гомологічні послідовності другого екзона (b₂) *M-bcr* локуса гена *BCR* і використовуються як 5' праймери в ПЛР;

B_I¹ 5' -ЦЦЦ.АТГ.ТТЦ.ЦГГ.ГАЦ.ААА.АГЦ -3'

B_{II}² 5' -АЦЦ.АТЦ.ГТГ.ГГЦ.ГТЦ.ЦГЦ.ААГ.А -3',

що відповідають послідовності I екзона *BCR* гена і використовуються для детекції філадельфійської хромосоми при ГЛЛ з точкою розриву в *m-bcr*;

2-II 5' -ГЦТ.ГАА.ГГГ.ЦТТ.ЦТТ.ЦТТ.ТАТ.ТГА.ТГ -3'

3-II 5' -ГЦТ.ГАА.ГГГ.ЦТТ.ТТГ.ААЦ.ТЦТ.ГЦТ.ТА -3'

I-II 5' -ГЦТ.ГАА.ГГГ.ЦТТ.ЦТГ.ЦГТ.ЦТЦ.ЦАТ. -3',

використовуються для виявлення злитих ділянок 2-го екзона (b₂) *M-bcr* гена, 3-го екзона (b₃) *M-bcr* гена та I екзона гена *BCR* з II екзоном *ABL* гена;

I_a 5' -АТЦ.ТГЦ.ЦТГ.ААГ.ЦТГ.ГТГ.ГГЦ.Т -3'

I_b 5' -ГЦА.ГЦА.ГЦЦ.ТГГ.ААА.АГТ.АЦТ.Т -3',

що комплементарні альтернативним екзомам I_a та I_b гена *ABL* і використовуються для виявлення нормального *ABL* гена.

кДНК отримували за допомогою зворотної транскриптази AMV, що була люб'язно надана В.М.Кавсаном, ІМБІГ НАН України. Система для проведення реакції складалась з 1-5 мкг РНК, 5-10 од РНазіну, 1мМ кожного з dNTP 10 рМ праймера A₁, буфера для зворотної транскриптази та 5-10 од фермента. Загальний об'єм суміші складав 40 μl. Реакцію проводили 45 хв при 42°C. Аліквоти реакційної суміші (5-10μl) використовували для проведення ампліфікації. Реакцію ампліфікації проводили в стандартній реакційній суміші для Biotaq полімерази з використанням відповідних праймерів (див рис.1). На першому етапі проводили 35 циклів за таких умов: 94°C -18 сек, 55°C -18 сек, 72°C -1 хв. Після першого етапу оцінювали специфічність ампліфікації за допомогою гібридизації, перенесених на капронові мембрани ампліфікатів, з міченими ³²P γАТФ зондами 2-II, 3-II, I-II. Далі проводили другий етап ПЛР 94°C -24 сек, 58°C -18 сек, 72°C -1 хв. Продукти ампліфікації аналізували в 6-% поліакриламідному гелі.

Результати та обговорення. Детекція *Ph'* хромосоми за допомогою геномних зондів. При утворенні філадельфійської хромосоми відбувається розрив у двох ділянках гена *BCR*: *M-bcr* (major breakpoint region) розміром 5,8 т.п.н. (рис.1) та *m-bcr* (minor breakpoint cluster region) -ділянка першого інтрона гена *BCR* (приблизно 20 т.п.н.) [4,10,17]. Розриви у ділянці *M-bcr* виявляються у всіх випадках виникнення ХМЛ, а також у 50% випадків ГЛЛ. В той же час розриви у ділянці *m-bcr* призводять переважно до розвитку ГЛЛ. Причини подібних розбіжностей на сьогодні не відомі. Розриви гена *Abl* відбуваються на ділянці довжиною близько 200 т.п.н. (між I та II екзонами). Наявність розривів в ділянці *M-bcr* робить можливим, при використанні відповідних зондів, детектувати зміни в структурі даного регіону. Ми використовували два геномних зонди: 5'-*BCR* зонд, що являє собою клонований *BglIII/HindIII* фрагмент *M-bcr*, розміром 2 т.п.н.; та 3'-*BCR* зонд (*BglIII/HindIII* фрагмент, розміром 1,2 т.п.н.), що був клонований в pSV-2 [5]. Зонди були люб'язно надані К.Бартрамом (Ulm,ФРН). На рис.2 представлено результати гібридизації

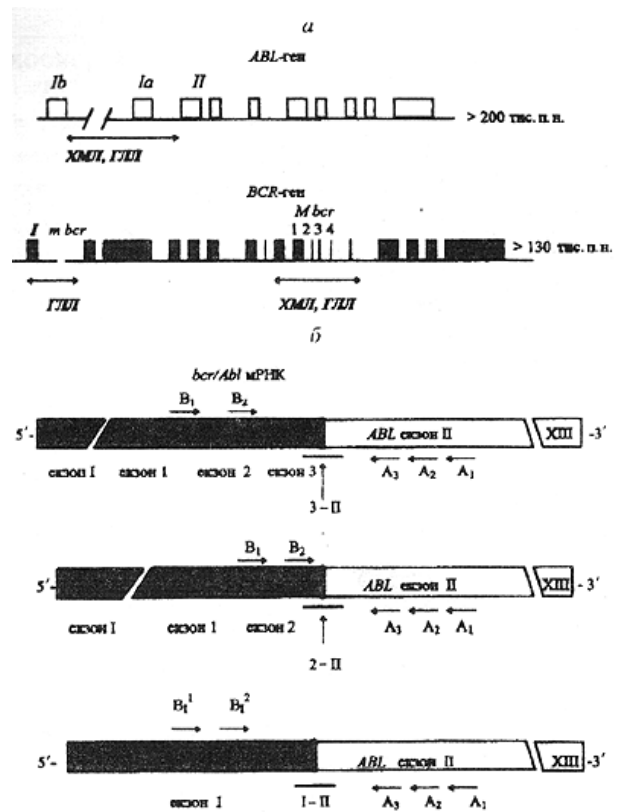


Рис.1 Схема організації BCR та ABL генів людини (а) та *bcr/abl* мРНК, що утворюються при ХМЛ та ГЛЛ (б).

а) *m-bcr* -minor breakpoint cluster region; *M-bcr* -major breakpoint cluster region; Ia та Ib -альтернативні екзони гена ABL; I -перший екзон гена BCR; 1,2,3,4 (*b₁* -*b₄*) -відповідно 12- екзони гена BCR; стрілкою позначені місця розриву генів; б) *A₁*, *A₂*, *A₃*; *B₁*, *B₂*; *B₁¹*, *B₁²* - праймери, що застосовуються в ПЛР діагностиці; 2 -II, 3 -II, I -II - олігонуклеотиди, для детекції злитних ділянок *bcr/Abl* генів.

Заштриховано *bcr* ділянку *bcr/Abl* мРНК, ділянка *Abl* незаштрихована.

рестрикованої *BglIII* геномної ДНК з 3'-BCR зондом. Наявність нормальної 22 хромосоми зумовлює появу одного фрагмента розміром 4,8 т.п.н. (доріжка 2), в той же час наявність філадельфійської хромосоми (розрив в ділянці *M-bcr*) зумовлює появу додаткового фрагменту, в даному випадку 5,6 т.п.н. (доріжка 1). Зробивши додаткову рестрикцію ДНК ферментом *Bam HI* та провівши гібридизацію з 5'*bcr* зондом можна локалізувати ділянку розрива в *M-bcr* [18]. Питання про те, наскільки прогностично важливим є така локалізація, на сьогодні залишається відкритим [4,17].

Однак, детекція *M-bcr* перебудов за допомогою геномних зондів певно не знайде клінічного застосування. Це обумовлено не тільки технічною складністю (використання радіоізотопів, проведення багаторазових гібридизацій тощо), а і тим, що даним методом неможливо детектувати Ph-лейкози з точкою розриву в регіоні *m-bcr*. Це спонукає до застосування інших методів, і зокрема полімеразної ланцюгової реакції.

Детекція філадельфійської хромосоми за допомогою ПЛР. Як згадувалось вище, розриви в BCR та ABL генах можуть відбуватися на значних за розміром ділянках, що робить проблематичним застосування ДНК ПЛР технології. В той же час, з врахуванням того, що BCR/ABL мРНК мають розмір 8,5 та 7 т.п.н.[5,9,10,19] та включають злиті екзони I гена BCR та II гена ABL (при ГЛЛ) та 13, 14 екзони гена BCR та II екзоном ABL гена (при ОЛЛ та ХМЛ), можна використовувати ПЛР для встановлення цих змін. Для одержання кДНК застосовували праймери *A₁*, *A₂* (рис.1б). Перший етап ампліфікації (30 циклів), що проводиться з використанням праймерів *A₁* та *B₁*, звичайно не дає такої кількості продукту, яка необхідна для візуального виявлення в агарозному гелі. Даний ампліфікат можна виявити за допомогою гібридизації з міченими ³²Pγ-АТФ зондами 2-II, 3-II, I-II, що виявляють ділянки злиття BCR та ABL екзонів (рис.1б).

Проведення другого етапу ПЛР, з використанням праймерів *A₂*, *A₃* та *B₂*, дозволяє виявити амплікати без проведення гібридизації та локалізувати точку розриву гена BCR. На рис.3 представлено результати такої ампліфікації. В даному випадку було виявлено фрагмент розміром 200 п.н., тому з врахуванням розміщення праймерів можна стверджувати, що в даному випадку розрив в гені *M-bcr* має місце між 3 та 4 екзонами, тобто має місце *b₃/a₂* транслокація.

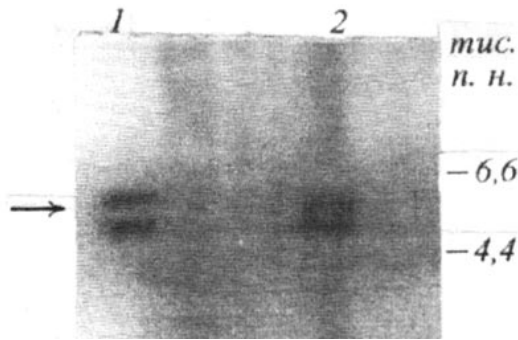


Рис.2 Детекція геномної перебудови за допомогою гібридизації з 3'-bcr зондом. ДНК розщеплювали ферментом Bgl II. 1 -ДНК, виділена з крові хворого на ХМЛ; 2 -ДНК здорового донора. Стрілкою вказано фрагмент, що відповідає філадельфійській хромосомі. Нижній фрагмент відповідає Bgl-Bgl рестрикту M-bcr локуса (4,8 т.п.н.).

Проведення ПЛР з використанням праймерів B_1^1 , B_1^2 та A_3 дозволяє виявляти фрагмент розміром 247 п.н., тобто детектувати характерну для ГЛЛ BCR/ABL перебудову з точкою розриву в m-bcr.

Таким чином представлені дані закладають методичну основу для детекції неопластичних клонів, дозволяють визначати кількість залишкових патологічних клітин, проводити ефективний контроль за процесом лікування. Наявність злитих генів дає змогу розробки нових підходів до терапії захворювань з використанням генно-інженерних конструкцій (антисенсів та рибозимів) [20-21]. Одержано перші дані, що свідчать про перспективність подібних робіт. Ці розробки базуються на сьогоденній інформації про розвиток патологічного процесу, в той час як відтворення повної картини для розвитку та протікання даного захворювання далеке до завершення. Сучасні дослідження направлені на вивчення функціональних властивостей різних доменів генів BCR та ABL [22-24], а також генів (антионкогенів, генів, що обумовлюють апоптоз тощо), що впливають на процес лейкогенезу [25-26].

Перспективними вбачаються розробки по вивченню природи бластних криз. На нашу думку важливим є вивчення ділянки dbl BCR гена [27], що можливо зумовлює різний перебіг захворювання при ГЛЛ та ХМЛ; виявлення змін в картині експресії генів; виявлення додаткових геномних змін.

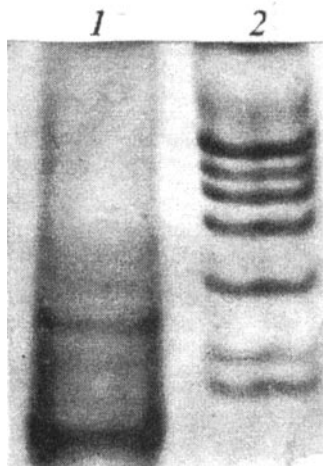


Рис.3 Детекція злитих bcr/abl генів за допомогою двоетапної ПЛР. Наведено результат електрофорезу в 6% акриламідному гелі. 1 -ампліфікат κДНК хворого 2 -ДНК плазмиди pBR322, розщеплена ферментом Alu I.

Автори висловлюють подяку В.М.Кавсану (ІМБіГ НАН України) за наданий фермент - зворотною транскриптазу AMV.

Робота виконувалась завдяки фінансовій підтримці Міністерства охорони здоров'я України.

Г. Д. Телегеев, М. В. Дыбков, М. В. Божко, Н. Н. Третьяк, С. С. Малиута

Использование молекулярно-биологических методов для выявления филадельфийской хромосомы у больных лейкозами

Резюме

В работе представлены данные по выявлению филадельфийской хромосомы у больных хронической миелоидной лейкемией (ХМЛ) и острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ). Используются два подхода: первый — с применением 5'- и 3'-Бсг геномных зондов, позволяющих установить наличие патологической хромосомы у больных с ХМЛ и у части больных с ОЛЛ; второй — с использованием двухэтапной полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфическими для ОЛЛ и ХМЛ праймерами. ПЦР-метод оказался более приемлемым для клинических условий. Обсуждается вопрос этиологии Ph'-лейкозов.

G. D. Teleguev, M. V. Dybkov, M. V. Bozhko, N. N. Tretiak, S. S. Matiuta

Molecular-biology approaches to detection of Philadelphia chromosome in patients with leukemia

Summary

The data on Philadelphia chromosome detection in patients with CML and ALL are presented. Two approaches were applied: 5' and 3' her genomic probes were used; two steps PCR with specific primers was employed. The latter is more preferable for clinic use. Some issues of Ph ' leukemias etiology are also discussed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weinberg R.A. Oncogenes and the molecular origins of cancer. // New York Cold Spring Harbor Lab.-1989, 367p.
2. Weinberg R.A. Tumor suppressor genes //Science.-1991.-254, N5035.-P.1138-1146.
3. Nowell P.C., Hungerford D.A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia // Science.-1960.-132, P.1497-1499.
4. Милс К.И. Ген BCR/ABL при хроническом миелолейкозе // Гематология и трансфузиология.-1993.-38, С.3-7.
5. Maurer J., Janssen J., Thiel E., et al. Deletion of chimeric BCR-ABL genes in acute lymphoblastic leukemia by the polymerase chain reaction // The Lancet.-1991.-337, N 8749.-P.1055-1058.
6. Propp S., Lizzi F.A. Philadelphia chromosome in acute lymphocytic leukemia //Blood.-1970.-36, N 2.-P.353-360.
7. Priest J.R., Robinson L., McKenna R.W., et al. Philadelphia chromosome positive childhood acute lymphoblastic leukemia // Blood.-1980.-56, N 1.-P.15-22.
8. Renshaw M.W., McWhirter J.R., Wang J.Y.J. The human leukemia oncogene bcr/abl abrogates the anchorage requirement but not the growth factor requirement for proliferation // Molecular and Cellular Biology.-1985.-15, N 3.-P.1286-1293.
9. Hooberman A.L., Carrino J.J., Leibowitz D., et al. Unexpected heterogeneity of BCR-ABL fusion mRNA detected by polymerase chain reaction in Philadelphia chromosome - positive acute lymphoblastic leukemia // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.-1989.-86, N11.-P.4259-4263.
10. Kawasaki E.S., Clark S.S., Coyne M.Y., et al. Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.-1988.-85, N 15.-P.5698-5702.
11. Daley G.Q., Ben-Neriah Y. Implicating the bcr/abl gene in the pathogenesis of the Philadelphia chromosome positive human leukemia // Adv. Cancer Res.-1991.-57, P.151-184.
12. Chan L.C., Karhi K.K., Raiter S.I., et al. A novel abl protein expressed in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia // Nature.-1987.-325, N 6105.-P.635-637.
13. Mathew S. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA // Methods in Mol. Biology.-1984.-2, P.31-34.
14. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // Analyt. Biochem. -1987. -162, P.156-159.
15. Маниатис Т., Фрич Э., Сембрук Д. Молекулярное клонирование // Москва, "Мир".-1984, 480 с.
16. Телегеев Г.Д., Дыбков М.В., Карпенко О.И., Черепенко Е.И. Молекулярные основы Ph'-лейкемий

- и пути их лечения. // Биополимеры и клетка.-1994.-10, N 5-С.78-92.
17. Туркина А.Г., Домнинский Д.А., Покровская Е.С., и др. Оценка прогностической значимости структуры хромосомной транслокации t(9;22) при хроническом миелолейкозе // Гематология.-1993, N3.-С.8-11.
 18. Ayscue L.H., Ross D.W., Ozer H., et al Bcr/abl recombinant DNA analysis versus karyotype in the diagnosis and therapeutic monitoring of chronic myeloid leukemia // Amer. J. of Clinic. Pathol.-1990.-94, N 4.-P.404-409.
 19. Домнинский Д.А., Покровская Е.С., Бабушкина Е.А., и др. Применение полимеразной цепной реакции для определения bcr/abl мРНК при хроническом миелолейкозе человека // Генетика.-1994.-30, N12.-С.1636-1639.
 20. Szczylik C., Skorski T., Nicolaidis N.C., et al. Selective inhibition of leukemia cell proliferation by bcr/abl antisense oligodeoxynucleotides // Science.-1991.-253, N 5019.-P.562-565.
 21. Женодарова С.М. Синтетические эндорибонуклеазы // Молекулярная биология.-1993.-27, N 2.-С.245-268.
 22. McWhirter J.R., Wang J.Y.J. An actin-binding function contributes to transformation by the BCR-ABL oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias // The EMBO Journal.-1993.-12, N 4.-P.1533-1546.
 23. Renshaw M.W., McWhirter J.R., Wang J.Y.J. The human leukemia oncogene bcr-abl abrogates the anchorage requirement but not the growth factor requirement for proliferation // Molecular and Cellular Biology.-1995.-15, N 3.-P.1286-1293.
 24. Goga A., McLaughlin J., Pendergast A.M., et al. Oncogenetic activation of c-ABL by mutation with its last exon // Molecular and Cellular Biology.-1993.-13, N 8.-P.4967-4975.
 25. Corter D., Kadlec L., Pendergast A.M. Structure and signaling requirement for BCR-ABL-mediated transformation and inhibition of apoptosis // Molecular and Cellular Biology.-1995.-15, N 10. -P.5531-5541.
 26. Welch P.J., Wang J.Y.J. Abrogation of retinoblastoma protein function by c-Abl through tyrosine kinase-dependent and independent mechanism // Molecular and Cellular Biology.-1995.-15, N 10. -P.5542-5551.
 27. Ron D., Zannim M., Levis M., et al. A region of proto-dbl essential for its transforming activity shows sequence similarity to a yeast cell cycle gene cdc 24, and the human breakpoint cluster gene bcr // New Biologist.-1991.-3, P.372-379.