

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

Г. Д. Телегєєв*, 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' всг геномних зондів, що дозволяють виявляти патологічну хромосому у хворих на ХМЛ та деяких хворих на ГЛЛ; другий — з використанням двоетапної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) зі специфічними для даних лейкозів праймерами. ПЛР-метод є прийнятнішим для клінічних умов. Обговорюється питання етиології Ph'-лейкозів.

Вступ. Розвиток злоякісних пухлин — це неконтрольний, необмежений ріст однієї, генетично-зміненої клітини (клона), що призводить до загибелі організму. Протікання даного процесу обумовлене 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 до цього процесу залучаються гени, що визначають диференціацію, проліферацію або виживання клітин. У другій порушується функція генів, які за норми пригнічують пухлинний ріст (гени-супрессори 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 (філадельфійська) хромосома [3]. Утворення згаданої хромосоми обумовлено реципрокною транслокацією між 9-ю та 22-ю хромосомами t(9; 22)(q34; q11). Ця хромосома виявляється у 95 % хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ), 25—30 % дорослих та 2—10 % дітей, хворих на гострий лімфобластний лейкоз (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 транляції є білок *BCR/ABL* з молекулярною масою (м. м.) 210 кДа (*p210*), що нараховує 927 чи 902 амінокислотних залишки гена *BCR* та 1097 амінокислотних залишків гена *ABL* [8—10]. Химерні білки характеризуються зміненою тирозинкіназною активністю [11], що і визначає розвиток

*Correspondence address.

першого етапу ХМЛ. У той же час при ГЛЛ утворюється злитий білок з м. м. 185 кДа (*p185*), що містить перші 426 амінокислот гена *BCR* та ті ж самі 1097 амінокислот гена *ABL*. Цей білок і спричинює розвиток клінічної картини ГЛЛ [12]. Наявність Рн-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 Рн-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 використано зразки крові хворих, що проходили лікування у гематологічних клініках 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 здійснювали за [10, 15].

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

A_1 : 5'-ТГА. ТТА. ТАГ. ЦЦТ. ААГ. АЦЦ. ЦГГ. А-3'

A_2 : 5'-ГГТ. ЦАТ. ТТТ. ЦАЦ. ТГГ. ГТЦ. ЦАГ. Ц-3'

A_3 : 5'-ТЦА. ГАЦ. ЦЦТ. ГАГ. ГЦТ. ЦАА. АГТ. Ц-3',

які комплементарні послідовностям 2-го екзона *ABL*-гена, необхідні для отримання кДНК та виступають 3'-праймерами у ПЛР;

B_1 : 5'-ГАА. ГТГ. ТТТ. ЦАГ. ААГ. ЦТТ. ЦТЦ. Ц-3'

B_2 : 5'-ГГА. ГЦТ. ГЦА. ГАТ. ГЦТ. ГАЦ. ЦАА. Ц-3',

які гомологічні послідовності другого екзона (b_2) *M-bcr*-локуса гена *BCR* і використовуються як 5'-праймери в ПЛР;

B_1^1 : 5'-ЦГЦ. АТГ. ТТЦ. ЦГГ. ГАЦ. ААА. АГЦ-3'

B_1^2 : 5'-АЦЦ. АТЦ. ГТГ. ГГЦ. ГТЦ. ЦГЦ. ААГ. А-3',

що відповідають послідовності I екзона *BCR*-гена і використовуються для детекції Рн-хромосоми при ГЛЛ з точкою розриву в *m-bcr1*;

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',

які використовуються для виявлення злитих ділянок 2-го екзона (b_2) *M-bcr*-гена, 3-го екзона (b_3) *M-bcr*-гена та I екзона гена *BCR* з II екзоном *ABL*-гена;

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

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

що комплементарні альтернативним ексонам Ia та Ib 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 містила 1—5 мкг РНК, 5—10 од. РНазину, 1 мМ кожного з dNTP, 10 рМ праймера A_1 , буфер для зворотної транскриптази та 5—10 од. ферменту. Загальний об'єм суміші складав 40 мкл. Реакцію проводили протягом 45 хв при 42 °С. Аліквоти реакційної суміші (5—10 мкл) використовували для проведення ампліфікації. Реакцію ампліфікації здійснювали в стандартній реакційній суміші для *Biotaq*-полімерази з застосуванням відповідних праймерів (рис. 1). На першому етапі проводили 35 циклів за таких умов: 94 °С — 18 с, 55 °С — 18 с, 72 °С — 1 хв, після чого оцінювали специфічність ампліфікації за допомогою гібридизації перенесених на капронові мембрани ампліфікатів з міченими [³²P] γ -АТФ зондами 2-II, 3-II, I-II. Далі проводили другий етап ПЛР: 94 °С — 24 с, 58 °С — 18 с, 72 °С — 1 хв. Продукти ампліфікації аналізували в 6—8 %-му поліакриламідному гелі.

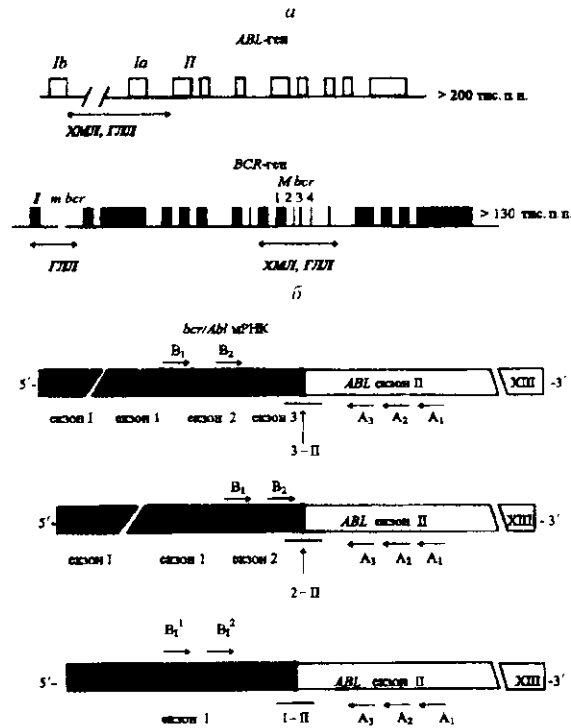


Рис. 1. Схема організації *BCR* та *ABL* генів людини (а) та *bcr/AbI* мРНК, що утворюються при ХМЛ та ГЛЛ (б). а: *m-bcr* — minor breakpoint cluster region; *M-bcr* — major breakpoint cluster region; Ia та Ib — альтернативні екзони гена *ABL*; 1 — перший екзон гена *BCR*; 1, 2, 3, 4 (b_1 — b_4) — відповідно 12—15-й екзони гена *BCR*; стрілкою позначені місця розриву генів; б: A_1 , A_2 , A_3 ; B_1 , B_2 ; B_1^1 , B_2^2 — праймери, що застосовуються в ПЛР-діагностиці; 2-П, 3-П, 1-П — олігонуклеотиди для детекції злитих ділянок *bcr/AbI* генів; заштриховано *bcr* ділянку *bcr/AbI* мРНК, ділянка *AbI* — незаштрихована

Результати та обговорення. Детекція Ph'-хромосоми за допомогою геномних зондів. При утворенні Ph-хромосоми відбувається розрив у двох ділянках гена *BCR*: *M-bcr* (major breakpoint cluster region) розміром 5,8 тис. п. н. (рис. 1) та *m-bcr* (minor breakpoint cluster region) — ділянка першого інтрона гена *BCR* (приблизно 20 тис. п. н.) [4, 16, 17]. Розриви у ділянці *M-bcr* виявляються у всіх випадках виникнення ХМЛ, а також у 50 % випадків ГЛЛ. У той же час розриви у ділянці *m-bcr* призводять переважно до розвитку ГЛЛ. Причини подібних розбіжностей на сьогодні невідомі. Розриви гена *Abl* відбуваються на ділянці довжиною близько 200 тис. п. н. (між I та II екзонами). Наявність розривів у ділянці *M-bcr* робить можливим при використанні відповідних зондів детектування змін у структурі даного регіону. Ми використовували два геномних зонди: 5'-*BCR*-зонд, що являє собою клонований *BglII/HindIII*-фрагмент *M-bcr* розміром 2 тис. п. н., та 3'-*BCR*-зонд (*BglII/HindIII*-фрагмент розміром 1,2 тис. п. н.), що був клонований у *pSV-2* [5]. Зонди були люб'язно надані К. Бартрамом (Ulm, ФРН). На рис. 2 представлено результати гібридизації рестрикованої *BglII* геномної ДНК з 3'-*BCR*-зондом. Наявність нормальної 22-ї хромосоми зумовлює появу одного фрагмента розміром 4,8 тис. п. н. (доріжка 2), в той же час наявність Ph-хромосоми (розрив у ділянці *M-bcr*) спричинює появу додаткового фрагмента, в даному випадку 5,6 тис. п. н. (доріжка 1). Здійснивши додаткову рестрикцію ДНК ферментом *VamHI* та провівши гібридизацію з 5'-*bcr*-зондом, можна локалізувати ділянку розриву в *M-bcr* [18]. Питання про те, наскільки прогностично важливим є така локалізація, на сьогодні залишається відкритим [4, 17].

Однак детекція перебудов *M-bcr* за допомогою геномних зондів, певно,

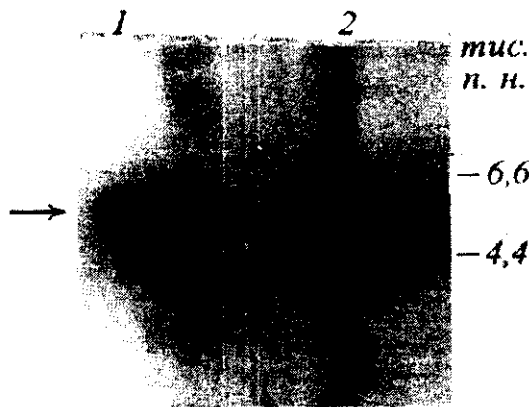


Рис. 2. Детекція геномної перебудови за допомогою гібридизації 3'-*bcr*-зондом. ДНК розщеплювали ферментом *Bgl*II: 1 — ДНК, виділена з крові хворого на ХМЛ; 2 — ДНК здорового донора. Стрілкою вказано фрагмент, що відповідає Ph-хромосомі. Нижній фрагмент відповідає *Bgl*-*Bgl*-рестрикту *M-bcr*-локусу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

не знайде клінічного застосування. Це обумовлено не тільки технічною складністю (використання радіоізотопів, проведення багаторазових гібридизацій тощо), а й тим, що даним методом неможливо детектувати Ph-лейкози з точкою розриву в регіоні *m-bcr*. Це спонукає до застосування інших методів і, зокрема, ПЛР.

Детекція Ph-хромосоми за допомогою ПЛР. Як згадувалося вище, розриви в генах *BCR* та *ABL* можуть відбуватися на значних за розміром ділянках, що робить проблематичним застосування ДНК-ПЛР-технології. У той же час, з урахуванням того, що *BCR/ABL* мРНК мають розмір 8,5 та 7 тис. н. [5, 9, 10, 19] та включають злиті екзони I гена *BCR* і II гена *ABL* (при ГЛЛ) та 13-й, 14-й екзони гена *BCR* і II екзон гена *ABL* (при ОЛЛ та ХМЛ), можна використовувати ПЛР для виявлення цих змін. Для одержання кДНК застосовували праймери A_1 , A_2 (рис. 1, б). Перший етап ампліфікації (30 циклів), що проводиться з використанням праймерів A_1 та B_1 , звичайно, не дає такої кількості продукту, яка необхідна для візуалізації в агарозному гелі. Даний ампліфікат можна ідентифікувати за допомогою гібридизації з міченими [32 P]γ-АТФ зондами 2-II, 3-II, 1-II, які виявляють ділянки злиття *BCR* та *ABL* екзонів (рис. 1, б).

Проведення другого етапу ПЛР з використанням праймерів A_2 , A_3 та B_2 дозволяє виявити ампліфікати без гібридизації та локалізувати точку розриву гена *BCR*. На рис. 3 представлено результати такої ампліфікації. У даному випадку було виявлено фрагмент розміром 200 п. н., тому з урахуванням розміщення праймерів можна стверджувати, що в цьому разі

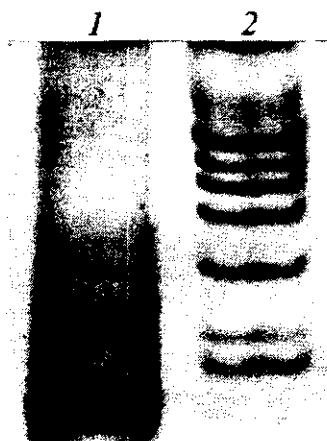


Рис. 3. Детекція злитих генів *bcr/abl* за допомогою двоетапної ПЛР. Наведено результат електрофорезу в 6 %-му акриламідному гелі: 1 — ампліфікат кДНК хворого; 2 — ДНК плазміди *pBR322*, розщеплена ферментом *Alu*I

розрив у гені *M-bcr* знаходиться між 3-м та 4-м екзонами, тобто має місце b_3/a_2 транслокація.

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

Таким чином, представлені дані закладають методичну основу для детекції неопластичних клонів, дозволяють визначати кількість залишкових патологічних клітин, здійснювати ефективний контроль за процесом лікування. Наявність злитих генів дає змогу розробляти нові підходи до терапії захворювань з використанням генно-інженерних конструкцій (антисенсів та рибозимів) [20, 21]. Одержано перші результати, які свідчать про перспективність подібних робіт. Ці розробки базуються на сьогоденній інформації стосовно розвитку патологічного процесу, у той час як відтворення повної картини розвитку та протікання даного захворювання далеке до завершення. Сучасні дослідження спрямовані на вивчення функціональних властивостей різних доменів генів *BCR* та *ABL* [22, 23], а також генів (антионкогенів, генів, зумовлюючих апоптоз, тощо), що впливають на процес лейкогенезу [24, 25].

Перспективними вбачаються розробки з вивчення природи бластних криз. На нашу думку, важливим є дослідження ділянки *dbl BCR*-гена [26], що, можливо, визначає різний перебіг захворювання при ГЛЛ і ХМЛ, виявлення змін у картині експресії генів та додаткових геномних змін.

Автори висловлюють подяку В. М. Кавсану (ІМБіГ НАН України) за наданий фермент — зворотну транскриптазу *AMV*.

Роботу виконано 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'-bcr геномных зондов, позволяющих установить наличие патологической хромосомы у больных с ХМЛ и участи 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. Telegееv, M. V. Dybkov, M. V. Bozhko, N. M. Tretiak, S. S. Maliuta

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' bcr 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 ЛІТЕРАТУРИ

1. Weinberg R. A. Oncogenes and the molecular origins of cancer.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1989.—367 p.
2. Weinberg R. A. Tumor suppressor genes // Science.—1991.—254, N 5035.—P. 1138—1146.
3. Nowell P. C., Hungerford D. A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia // Ibid.—1960.—132.—P. 1497—1499.

4. Mills K. I. 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 // Ibid.—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 // Mol. and Cell. Biol.—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. Nat. Acad. Sci. USA.—1989.—86, N 11.—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* // Ibid.—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., Raïter 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 eukaryotic DNA // Meth. Mol. Biol.—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.—М.: 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.— N 3.—С. 8—11.
18. Ayscye 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. Clin. 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, N 12.—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 // Молекуляр. 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 // EMBO J.—1993.—12, N 4.—P. 1533—1546.
23. Goga A., McLaughlin J., Pendergast A. M. et al. Oncogenetic activation of *c-ABL* by mutation with its last exon // Ibid.—1993.—13, N 8.—P. 4967—4975.
24. Corter D., Kadlec L., Pendergast A. M. Structure and signaling requirement for *BCR-ABL*-mediated transformation and inhibition of apoptosis // Ibid.—1995.—15, N 10.—P. 5531—5541.
25. Welch P. J., Wang J. Y. J. Abrogation of retinoblastoma protein function by *c-Abl* through tyrosine kinase-dependent and independent mechanism // Ibid.—P. 5542—5551.
26. 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.